

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BASSAM FELIPE MOGHARBEL

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E DA ATIVIDADE  
PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA  
ÓSSEA EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS E/OU  
TIREOIDECTOMIZADAS.**

CURITIBA

2011

BASSAM FELIPE MOGHARBEL

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E DA ATIVIDADE  
PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA  
ÓSSEA EM RATAS OOFORRECTOMIZADAS E/OU  
TIREOIDECTOMIZADAS.**

Trabalho de conclusão de curso para  
Obtenção de grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas. Realizado no  
departamento de Biologia Celular do  
Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná –  
UFPR, sob orientação da:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Katherine Athayde Teixeira  
de Carvalho e co-orientação da Prof.<sup>a</sup>  
Dr.<sup>a</sup> Cláudia Feijó Ortolani-Machado

CURITIBA

2011

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas.

À meu pai pela grande contribuição pelo que sou hoje.

À Luana pela ajuda, incentivo e apoio.

À minha família que além de todo o apoio, me ajudou a conseguir as cascas de ovos, junto com eles a Dona Ecilda e a Ju.

À professora doutora Katherine Athayde Teixeira de Carvalho pela maravilhosa oportunidade de pesquisa, orientação, confiança, compreensão e apoio nos momentos de dificuldades.

À professora doutora Claudia Feijó Ortolani-Machado co-orientadora que se prontificou em aceitar o projeto, dando-me a chance de conseguir apresentar minha pesquisa como monografia.

À mestre Míriam, que se dispôs a oferecer seu tempo, esforço e conhecimento.

A todos do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, pela amizade, ajuda e conselhos durante minhas atividades e experimentos, em especial para a Ana, Julio, Ricardo, Carol, Daiany.

Aos meus amigos Hideki, Rodrigo, Luis e Felipe, pela companhia, força e amizade nesses anos de faculdade.

Às minhas queridas ratinhas que não me deram nenhum trabalho e que sem elas nada disso teria sido feito.

## RESUMO

Hipotireoidismo é uma das patologias mais freqüentes em mulheres de meia idade, sendo que nesse período se dá o início do climatério. Com o objetivo de analisar as diferenças no aumento ou na diminuição da porcentagem de células da linhagem mononuclear da medula óssea, devido a falta de hormônios ovarianos e/ou tireoidianos, foi feita a ooforectomia e/ou tireoidectomia em ratas da linhagem Wistar adultas. Para a confirmação do estado de hipotireoidismo foi feita a dosagem de TSH, também foi feita a coloração de Papanicolau para comprovação do estado de diestro nas ratas ooforectomizadas. Para a obtenção das células mononucleares foi feita a punção e aspiração da medula-óssea da crista íliaca e em seguida o isolamento das células mononucleares através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. Foram usados marcadores específicos para proteínas de membrana de células endoteliais, células precursoras B/pró-B e células-tronco mesenquimais. Para a identificação e quantificação da porcentagem dessas diferentes populações, foi utilizado o citometro de fluxo. Foi comprovado que os grupos tireoidectomizados estavam com hipotireoidismo e os grupos ooforectomizados estavam no período diestro do ciclo estral. Os resultados mostram que os grupos com hipotireoidismo obtiveram um aumento na porcentagem de células endoteliais. Com a falta dos hormônios ovarianos houve um aumento nas células precursoras B/pró-B. Também houve diminuição da porcentagem de células-tronco mesenquimais nos grupos ooforectomizados. Foi visto que os hormônios ovarianos estão diretamente ligados na lipopoiése das células da linhagem B, juntamente com regulação da produção das células-tronco mesenquimais. No hipotireoidismo há um aumento das células endoteliais na medula óssea. Sendo assim, tanto os hormônios ovarianos e tireoidianos possuem funções fundamentais na regulação dessas três populações de células da medula óssea.

Palavras-chave: hipotireoidismo, estrógeno, célula precursora B, célula-tronco mesenquimal, célula endotelial, aterosclerose, medula-óssea, Wistar, ooforectomia, tireoidectomia, TSH.

## ABSTRACT

Hypothyroidism is one of the most frequent pathologies in middle-age women, and in this period occurs the beginning of the climacterium. In order to analyze the differences in the increase or decrease in percentage on the mononuclear cells lineage of the bone marrow due the lack of thyroid and/or ovarian hormones, was made an oophorectomy and/or thyroidectomy in adult Wistar female rats. For the confirmation of the hypothyroidism status, was made a TSH measurement, also a Papanicolaou stain was performed for the confirmation of the diestrus stage in oophorectomized rats. To obtain the mononuclear cells, was done a puncture and aspiration of the bone marrow from the iliac crest and then the isolation of the mononuclear cells through density gradient Ficoll-Hypaque. Specific membrane proteins markers were used to identify, endothelial cells, precursor B/pro-B cells and mesenchymal stem cells. For the identification and quantification of the percentage of these different cells population, was used a flow cytometer. It appeared that the thyroidectomized groups were indeed with hypothyroidism and the oophorectomized groups were in the diestrus stage of the estrous cycle. The results showed that the groups with hypothyroidism had increased their endothelial cell percentage. With the lack of the ovarian hormones the percentage of the B precursors/pro-B cells had increased. Also in the oophorectomized group the percentage of the mesenchymal stem cell decreased. Has been seen that the ovarian hormones are directly linked with the B cells lymphopoiesis, along with the regulation and production of mesenchymal stem cells. In hypothyroidism the percentage of endothelial cells had increased. Thus, both ovarian and thyroid hormones had important function in the regulation no these three mononuclear cells population.

Keywords: hypothyroidism, estrogen, precursor B cell, mesenchymal stem cell, endothelial cell, atherosclerosis, bone marrow, Wistar, ovariectomy, thyroidectomy, TSH.

## LISTA DE SIGLAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D  
BMP: Proteína morfogenética óssea  
BrdU: Bromodeoxiuridina  
CD: *Cluster of differentiation*  
CoA: Proteína co-ativadora  
CoR: Proteína correpressora  
CTM: Célula-tronco mesenquimal  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
K-W: Kruskal-Wallis  
M-W: Mann-Whitney  
PBS: Phosphate buffered saline  
RXR: Receptor de retinóide X  
SMAD: *Mothers against decapentaplegic proteins*  
T<sub>3</sub>: Triiodotironina  
T<sub>4</sub>: Tiroxina  
TGF: Fator transformador de crescimento  
TRs: Receptores dos hormônios tireoidianos  
TSH: *Thyroid-stimulating hormone*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 Material Biológico .....	15
3.2 Cirurgias .....	16
3.2.1 Ooforectomia .....	16
3.2.2 Tireoidectomia .....	17
3.3 Exame para determinação do TSH.....	18
3.4 Teste de Papanicolau .....	18
3.5 Punção e isolamento das células mononucleares da medula óssea.....	19
3.5.1 Punção das células mononucleares da medula óssea da crista ilíaca	20
3.5.2 Isolamento das células mononucleares da medula óssea .....	21
3.6 Imunofenotipagem .....	22
3.7 BrdU .....	24
3.7.1 Protocolo para a marcação com BrdU .....	24
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 TSH .....	26
4.2 Citometria de Fluxo: Análise Imunofenotípica e Estatística.....	31
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário, os diferentes tipos de células são determinados, dando origem a um organismo multicelular complexo. No período após o crescimento, as células podem limitar a sua capacidade proliferativa com certas restrições moduladas e sua característica específica permanece possivelmente fixada na expressão gênica. A proliferação celular ocorre, mas não mais com a eficiência e rapidez de um organismo embrionário ou fetal.

A maioria das células-tronco adultas mantém a mesma taxa de proliferação e caráter especializado, mesmo transferindo-a em um novo ambiente. Porém, as células especializadas podem retomar um potencial proliferativo, mas de forma limitada. Em um tecido adulto, surgem freqüentemente células diferenciadas devido a continua renovação celular, originárias de duas fontes: formar-se pela simples duplicação de células diferenciadas, que se dividem para dar outras células filhas do mesmo tipo; ou elas podem ser geradas a partir de células-tronco relativamente indiferenciadas por um processo que envolve situações pouco conhecidas apresentando um direcionamento do seu fenótipo celular para um fenótipo semelhante ao tecido que sofreu injúria ou hospedeiro. Estas células-tronco são encontradas na maioria dos órgãos, mas o local mais freqüente é o sangue da medula óssea, e dentre este a medula óssea da crista ilíaca é a região preferencial de coleta, devido ao volume maior de sangue e fácil acesso.

As células-tronco apresentam notada capacidade de originarem tecidos a partir de sua forma indiferenciada. Estas células, em seus sítios, passam do estado quiescente, diferenciando-se em tipos celulares diversos quando necessário.

As células-tronco mononucleares oriundas da medula óssea apresentam linhagens celulares distintas tendo funções específicas: as células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco não hematopoiéticas (CHACHQUES *et al.*, 2004). As células-tronco hematopoiéticas apresentam a função de dar origem aos componentes do sangue. Já as células progenitoras endoteliais apresentam função de secretar diversos fatores de crescimento endotelial, promovendo angiogênese nos tecidos patológicos (WERNER *et al.*, 2005). As células-tronco não hematopoiéticas demonstram grande plasticidade, foram primeiramente descritas como células estromais, mas muito recentemente elas têm sido designadas como células-tronco mesenquimais (CTM),

porque é delas a capacidade para diferenciação para linhagens mesodérmicas: miogênicas, osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. Além disto, as CTM são capazes de diferenciar em células derivadas do mesoderma e também dos outros folhetos, inclusive do ectoderma como as células da glia (YE *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2005).

Uma das maneiras de identificar estas três linhagens celulares, hematopoiética, endotelial e mesenquimal, é através de seus marcadores de membrana. As células-tronco hematopoiéticas apresentam os marcadores de membrana CD45(+) e CD34(+), as células endoteliais possuem CD34(+) CD45(-) e enquanto CTM são CD45(-) e CD34(-), assim como a capacidade de adesão ao substrato da linhagem mesenquimal (GROUNDS *et al.*, 2002). Outras células também possuem o mesmo fenótipo CD45(-) e CD34(+), como plaquetas e células da linhagem eritróides, então a diferenciação pode ser feita através de outros marcadores mais específicos como o CD31 e neste marcador é feita a diferenciação através da expressão dessas células, sendo uma expressão mais fraca a célula endotelial e mais forte a plaqueta.

As extensas pesquisas referentes às células-tronco oriundas da medula óssea projetam seus benefícios na regeneração tecidual, como na formação de novos vasos sanguíneos, o que motiva pesquisadores a realizar exaustivas pesquisas experimentais e clínicas na tentativa de efetivar seu uso nas terapias de angiogênese (TERADA *et al.*, 2002).

Os sistemas que auxiliam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de populações progenitoras diversas dependem de fatores secretados por outros tipos celulares. Uma ampla gama de fatores secretados regula o destino e proliferação das células-tronco.

Em resposta aos fatores de crescimento e proliferação celular, existe o mecanismo de rota de comunicação celular onde formas diferentes de sinais são utilizadas para representar a mesma informação através da transdução de sinais celulares. A sinalização celular ocorre através de moléculas especializadas em receber e emitir estes sinais, a célula sinalizadora, que é detectada por outra, a célula alvo, por meio de receptores protéicos.

As moléculas sinalizadoras, neste caso, os hormônios, são substâncias químicas produzidas por uma parte do corpo e que atuam no sentido de controlar algumas funções do organismo, atuando nas atividades biológicas das células, tais

como: crescimento, desenvolvimento, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares. Portanto, as células e um grande número de enzimas, proteínas estruturais, proteínas transportadoras e outras substâncias aumentam. O resultado final de tudo isso é um aumento generalizado da atividade funcional por todo corpo e conseqüentemente, da proliferação celular (ALBERTS *et al.*, 2002).

Os hormônios tireoidianos atuam indiretamente na regulação da transcrição de genes que influenciam todos os sistemas orgânicos, portanto, as manifestações clínicas de sua deficiência são caracteristicamente insidiosas, múltiplas e diversas. Suas ações fisiológicas podem ser classificadas em dois tipos: as que afetam o metabolismo e as que afetam o crescimento e desenvolvimento celular. Estes hormônios por sua vez exercem efeito essencial para o crescimento através da ação direta sobre as células, produzindo um aumento geral do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e das proteínas.

A principal forma do hormônio tireoidiano secretada pela glândula tireóide é a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T<sub>4</sub>) e uma menor quantidade é secretada como 3,5,3'-triiodotironina (T<sub>3</sub>), a forma ativa do hormônio. A concentração de T<sub>4</sub> é cerca de 45 vezes maior que a de T<sub>3</sub> (90nM versus 2nM) e a principal fonte de produção de T<sub>3</sub> ocorre através da conversão de T<sub>4</sub> em T<sub>3</sub> por meio da 5' desiodação de T<sub>4</sub> nos tecidos periféricos promovida pelas desiodases (BARRA *et al.*, 2004).

As ações desses hormônios necessitam de receptores na membrana celular e receptores nucleares localizados no citoplasma. O receptor de membrana é localizado na integrina  $\alpha V\beta 3$  no sítio de reconhecimento Arg-Gly-Asp (DAVIS *et al.*, 2008).

A regulação transcricional é mediada por receptores dos hormônios tireoidianos (TRs). Os TRs pertencem à superfamília de receptores nucleares que compreende 49 genes que codificam 75 proteínas diferentes, que estão envolvidas na transdução de sinais hormonais extracelulares em respostas transcricionais. Eles são codificados por dois genes distintos,  $\alpha$  e  $\beta$ , localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Estas isoformas apresentam diferentes funções e sua expressão é específica para cada tecido. O TR se liga ao DNA como monômero, homodímero ou heterodímero com o receptor de retinóide X (RXR). Independente da forma, se liga em uma proteína corressora (CoR) na ausência do hormônio T<sub>3</sub>, que resulta na repressão transcricional. Na presença do hormônio, TR se liga em proteínas coativadoras (CoA), que acetilam histonas e relaxam a cromatina na região promotora.

Essas modificações permitem a organização da maquinaria de transcrição basal e ativação da transcrição (TAGAMI *et al.*, 2009).

A maioria dos efeitos dos hormônios ocorre via regulação transcricional de genes regulados pelo TRa ou TRb. Entretanto, existem várias evidências de que o T<sub>3</sub> e o T<sub>4</sub> podem exercer alguns de seus efeitos via mecanismos não genômicos, como por exemplo, a ativação de cinases, calmodulina (proteína receptora Ca<sup>++</sup>, mediando diversos processos de regulação de Ca<sup>++</sup>), captação de glicose em vários tecidos e modulação do transporte de cálcio (DAVIS *et al.*, 2002).

O hipotireoidismo é a patologia mais freqüente da glândula tireóide. Na maioria dos casos é provocado por alterações que afetam a própria glândula tireóide (hipotireoidismo primário), não produzindo hormônio em quantidade suficiente.

Há uma prevalência crescente de hipotireoidismo com o avançar da idade em doenças de tireóide clínica: 2,4% e a de tireóide subclínica: 23,2%. Entre o grupo com doença de tireóide subclínica, 73,8% são hipotireoidismo e 26,2% são hipertireoidismo. Particularmente na população de mulheres pós-menopausa na mesma faixa etária, apresenta riscos elevados para cardiopatias isquêmicas, grupo de risco para indicação de Terapia Celular na Miocardiopatia Isquêmica Crônica (BARRA *et al.*, 2004).

Nesta mesma faixa etária, ocorre o *climatério*, fim do período fértil da mulher, que é caracterizado no ser humano por instabilidade vascular (fogachos e suores noturnos), um aumento na incidência de doença do coração e um aumento na velocidade da perda óssea (osteoporose) (DAVIS *et al.*, 2008).

O principal hormônio cujos níveis são afetados é o estrogênio. A família dos esteróides estrogênicos endógenos inclui o estradiol, a estrona e o estriol. O 17-β-estradiol é o mais potente e no gênero feminino é responsável pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. O estradiol é produzido principalmente pelos ovários e com produção secundária pelas glândulas supra-renais e conversão dos precursores esteróides em estrogênios nos tecidos de gordura (em ambos os sexos).

A função principal do estrogênio é causar a proliferação e o crescimento dos tecidos e órgãos sexuais ou de outros tecidos relacionados com a reprodução, mas seu papel não se limita a funções reprodutivas. Os estrógenos também desempenham importante papel no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

Acredita-se que o estrogênio inibe exclusivamente a reabsorção óssea, mas estudos demonstraram que o Estradiol aumenta o mRNA da proteína morfogenética óssea (BMP)-2 nas CTM, o que sugere que o estrogênio também aumente a formação óssea (ZHOU *et al.*, 2003).

As BMPs são produtos de matriz óssea desmineralizada com a propriedade de formação do tecido ósseo e são componentes dos fatores de crescimento, tais como o fator transformador de crescimento (TGF). Estes promovem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos, com conseqüente organização do tecido ósseo. As BMPs se ligam aos receptores específicos existentes na superfície das células osteoinduzidas, ativam as proteínas citoplasmáticas *mothers against decapentaplegic proteins* (SMAD) e no núcleo da célula receptora, passam a regular a transcrição de genes relacionados com calcificação e formação óssea (BARROS *et al.*, 2002).

Diante deste quadro, surge o interesse de se estudar a influência hormonal na identificação do perfil imunocitoquímico e da identificação da fase de proliferação das células-tronco; em especial dos hormônios da tireóide e do estrogênio por seu importante papel na modificação do metabolismo celular, principalmente no gênero feminino.

Várias pacientes já estão sendo submetidas às coletas de medula óssea em projetos multicêntricos de Miocardiopatia no Brasil, com propósito de isolamento de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, sem a atenção devida de análise prévia do estado proliferativo das células a serem transplantadas, fator este significativo e determinante para o bom resultado terapêutico.

Para haver integração das células-tronco transplantadas *in vivo* ou para expansão celular *ex-vivo*, há necessidade das células estarem em fase proliferativa para garantia de maior sucesso no transplante e de maior capacidade proliferativa na sua expansão. A análise da atividade proliferativa é feita com o auxílio da Bromodeoxiuridina (BrdU), o qual é incorporado pelas células durante a fase S da mitose. Esta marcação pode ser visualizada através de técnicas imunocitoquímicas e não requer auto-radiografia e podendo ser quantificadas por citometria de fluxo (KIT *et al.*, 1958).

Tendo em vista essas características, achou-se necessário avaliar os efeitos da falta dos hormônios tireoidianos e ovarianos nas células mononucleares da medula óssea, e com o auxílio de marcadores mais específicos e a expressão

destes analisados pela técnica de citometria de fluxo, é possível identificar e classificar algumas das populações, e verificar se há ou não diferença nos grupos onde há a falta desses hormônios.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência dos hormônios da tireóide e do estrogênio nas células-tronco mononucleares da medula óssea.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a)** Identificar o perfil imunofenotípico das células mononucleares oriundas da medula óssea através da técnica de citometria de fluxo.
- b)** Identificar a proporção de células mononucleares da medula óssea na fase proliferativa através da técnica de citometria de fluxo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Biológico

Foram utilizadas quarenta fêmeas de *Rattus Norvegicus Albinus*, da linhagem Wistar, com idade aproximada de três meses, com peso variando de 250g a 350g. Elas foram separadas em 4 grupos distintos, sendo eles: controle, ooforectomizadas, tireoidectomizadas e tireoidectomizadas/ooforectomizadas.

As ratas foram alojadas em caixas de polipropileno, sendo de três a quatro animais por caixa. As caixas foram devidamente separadas e identificadas com crachás individuais para cada animal, contendo: número da rata, grupo a qual pertence e data da cirurgia (FIGURA 1).

#### Bassam Felipe Mogharbel

Rata n° :\_\_\_\_\_

Data da cirurgia:\_\_\_/\_\_\_/ 2010

Controle

Tireoidectomia/ paratireoidectomia

Ooforectomia

Obs:\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

FIGURA 1 – Crachá para identificação do animal, este era fixado na caixa onde o animal se encontrava.

Ratas de grupos distintos não eram alojadas com as outras de outros grupos. Elas foram mantidas sob uma temperatura constante de 20°C±2 graus e umidade do ar própria do ambiente, com ciclos de luz a cada 12 horas. Tiveram livre acesso à água e à ração padronizada para a espécie. As ratas tireoidectomizadas receberam adição de meia casca de ovo por animal a cada dois dias para que houvesse uma melhor reposição de cálcio (FIGURA 2).



FIGURA 2 - Rata Roendo Casca de Ovo. Devido à tireoidectomia, necessita-se de fonte suplementar de  $Ca^{++}$ .

### 3.2 Cirurgias

Todas as ratas que sofreram as cirurgias foram anestesiadas com a administração de 50mg/kg de quetamina e 10mg/kg de xilazina, ambas por via intramuscular.

#### 3.2.1 Ooforectomia

A ooforectomia bilateral foi realizada após a tricotomia abdominal e os procedimentos para antisepsia com álcool iodado na região operatória. Então, foi feita uma incisão mediana xifopúbica, procedendo-se à abertura abdominal por planos e divulsão da musculatura reto abdominal oblíqua e peritônio para localização, identificação dos paramétrios bilateralmente, posterior ligadura e remoção dos ovários bilateralmente. Suturou-se o plano abdominal com ponto e, em seguida, realizou-se a síntese da pele, do tecido celular subcutâneo, utilizando-se fio monofilamentar de náilon 4.0 recorreu-se a sutura interrompida simples (FIGURA 3).

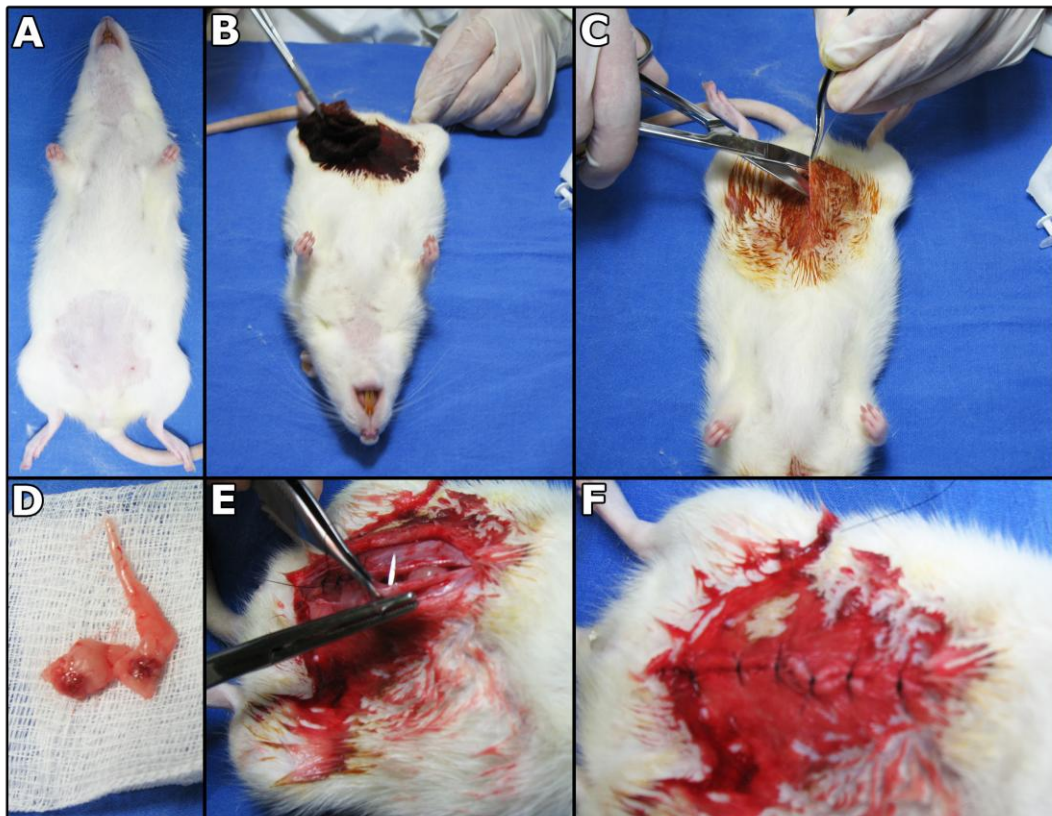


FIGURA 3 – Ooforectomia. Em A, a cobaia foi anestesiada e foi feita a tricotomia do local onde foi feita a incisão. Em B, o local foi limpo e foi feita a antissepsia. Em C, a pele foi divulsionada. Em D, mostrando os dois ovários após a ooforectomia bilateral. Em E, iniciou-se a sutura da musculatura abdominal. Em F, terminou-se a sutura da pele com a utilização da sutura interrompida simples.

### 3.2.2 Tireiodectomia

Para a tireoidectomia, foi feita a tricotomia da região cervical anterior e a fixação do animal à mesa cirúrgica, procedendo-se à antissepsia da região operatória com álcool iodado. Realizou-se então uma incisão mediana que se estendeu do bordo inferior da mandíbula até a base do pescoço (fúrcula esternal), interessando a pele e o tecido celular subcutâneo. Afastou-se as glândulas salivares e o com o deslocamento do músculo esternoióideo, assegurou-se um melhor acesso à glândula tireóide, que esta localizada sobre a traquéia, com seu istmo entre o terceiro e quarto anéis, logo abaixo da hipofaringe, então é feita a retirada da glândula com uma tesoura cirúrgica de ponta curva.

O plano muscular foi suturado com um ponto de fio poliglactina 3.0 e em seguida, realizou-se a síntese da pele, do tecido celular subcutâneo e rafe mediana,

utilizando-se fio monofilamentar de náilon 4.0, para isto recorreu-se a sutura interrompida simples (FIGURA 4).

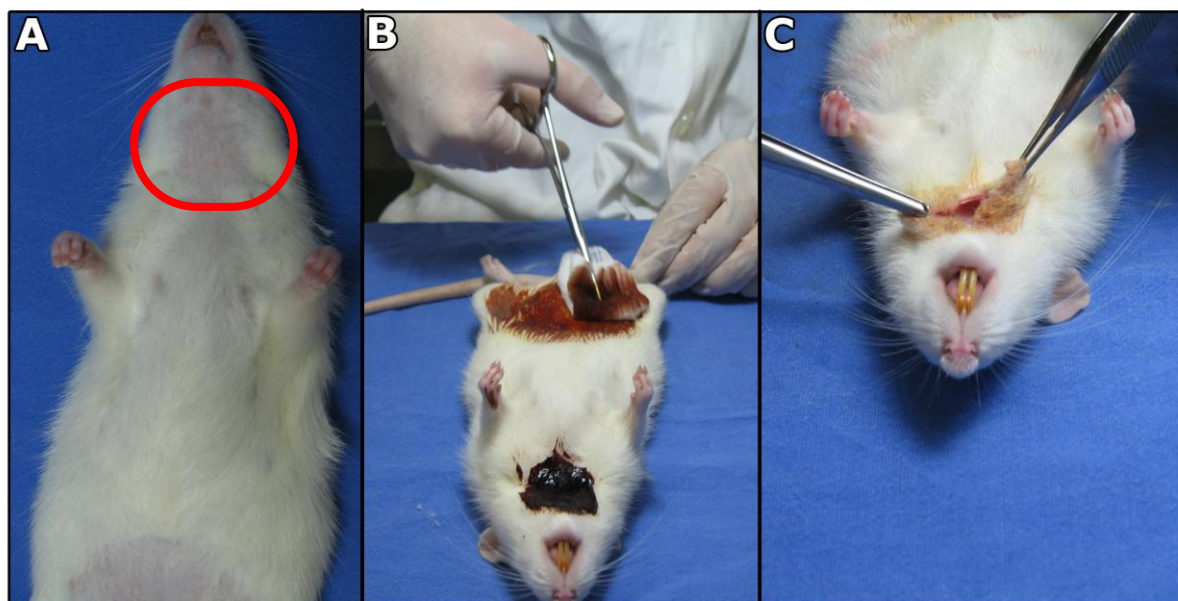


FIGURA 4 – Tireoidectomia. Em A, tricotomia da região. Em B, antisepsia do local. Em C, incisão para acesso a glândula tireóide.

### 3.3 Exame para determinação do TSH

Para confirmar que as cobaias estavam sobre processo de hipotireoidismo foi feito um teste com amostras de sangue basal, teste que foi realizado por uma empresa terceirizada especialista em exames em animais (Bionostic). Após 30 dias dos procedimentos cirúrgicos sobre a glândula tireóide e ovários, foi realizada, em cada animal, a punção cardíaca, com agulha 25 X 07 mm, sob anestesia quetamina 50 mg/kg/peso. Retirou-se 3 ml de sangue para dosagem de TSH ultra-sensível (método eletroquimioluminescência autoanalisador/ Elecsys/ Roche), tiroxina total (método eletroquimioluminescência autoanalisador/ Elecsys/ Roche) e dosagem de estradiol, adotando-se, então, como valores de referência, os resultados do grupo de controle. Em seguida, administraram-se 3 ml de solução salina isotônica a 0,9% na cavidade peritoneal.

### 3.4 Teste de Papanicolau

Para a confirmação do estado de diestro foram feitos esfregaços em todas as ratas de todos os grupos, seguido da coloração Papanicolau e a análise da proporção de células, esta descrita por Long e Evans (1922) e Mandl (1951). O

protocolo usado para a coloração foi modificado de Hubscher e colaboradores (2005). Apresentado a seguir (TABELA 1).

TABELA 1 – PROTOCOLO ADAPTADO PARA COLORAÇÃO PAPANICOLAU

CUBA	REATIVO	TEMPO
1	Etanol a 80%	2 minutos
2	Etanol a 70%	2 minutos
3	Etanol a 50%	2 minutos
4	Água Destilada	2 minutos
5	Hematoxilina de Harris	1 minuto e 30 segundos
6	Água corrente	10 mergulhos rápidos
7	Etanol a 50%	2 minutos
8	Etanol a 70%	2 minutos
9	Etanol a 80%	2 minutos
10	Etanol a 96%	2 minutos
11	Orange G6	2 minutos
12	Etanol a 96%	2 minutos
13	EA-36	2 minutos
14	Etanol a 96%	2 minutos
15	Xilol	2 minutos

FONTE: Modificado de HUBSCHER *et al.*, (2005).

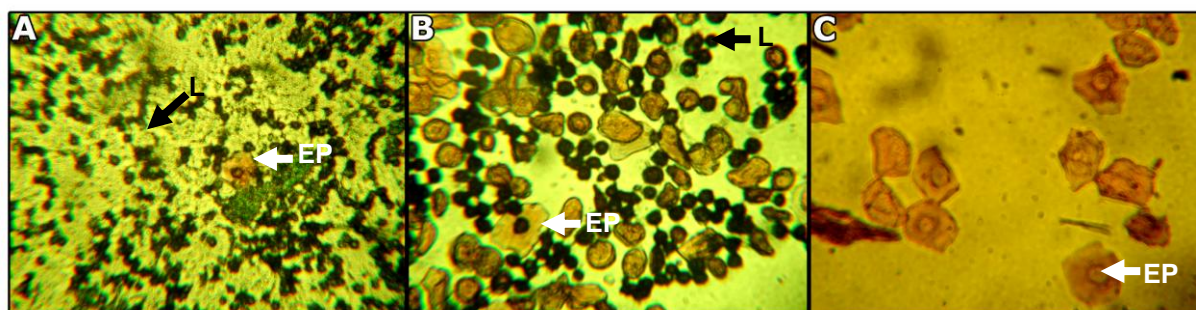


FIGURA 5 – Amostras de Esfregaço Vaginal com Coloração Papanicolau. Em A, amostra de um esfregaço vaginal de uma cobaia tireoidectomizada. Nota-se a grande quantidade de linfócitos (Seta preta) caracterizando o estado de metaestro. Em B, uma amostra de esfregaço de uma rata ooforectomizada, em estado de diestro, nota-se uma quantidade grande de linfócitos (seta preta), porém, com algumas células epiteliais (seta branca). Em C, temos um exemplo de proestro de uma cobaia controle, o número de linfócitos é muito pequeno ou nulo e foram identificadas células epiteliais (seta branca).

As ratas ooforectomizadas tiveram seu ciclo estral paralizado no estado de diestro, diferentemente das não ooforectomizadas, que continuavam seu ciclo estral normalmente. Com isso foi possível confirmar que a ooforectomia foi bem sucedida.

### 3.5 Punção e isolamento das células mononucleares da medula óssea

O isolamento foi feito logo em seguida da punção, pois mesmo com a seringa heparinizada o sangue corre o risco de coagular, e se isso ocorrer, se perde a amostra.

### 3.5.1 Punção das células mononucleares da medula óssea da crista ilíaca

Com animal devidamente anestesiado, foi feita a limpeza da área onde se inseriu a agulha, com tesoura ou barbeador elétrico, para a retirada mais grosseira da pelagem. Então, com um aparelho de barbear manual, foi feita raspagem mais delicada, para que não houvesse contato de pelos com o material a ser coletado. Foi feito o procedimento asséptico com álcool iodado da região dorso-posterior da rata, para que a região da crista ilíaca ficasse exposta para a inserção da agulha. Então, foi feita uma flexão de uma das patas traseira da rata, juntamente com o movimento de abdução. Com isso a crista ilíaca fica a mostra, facilitando a inserção da agulha. Após atravessar o osso, a seringa permaneceu fixa, e então foi feita a aspiração. Repetiu-se o procedimento na outra crista. Foi usado uma seringa de 3ml com 0,1ml de heparina sódica para diminuir a velocidade de coagulação do aspirado e foi retirado de 2 a 3ml das duas aspirações das cristas de cada rata. Depois do processo foi feita mais uma vez a assepsia do local (FIGURA 6).

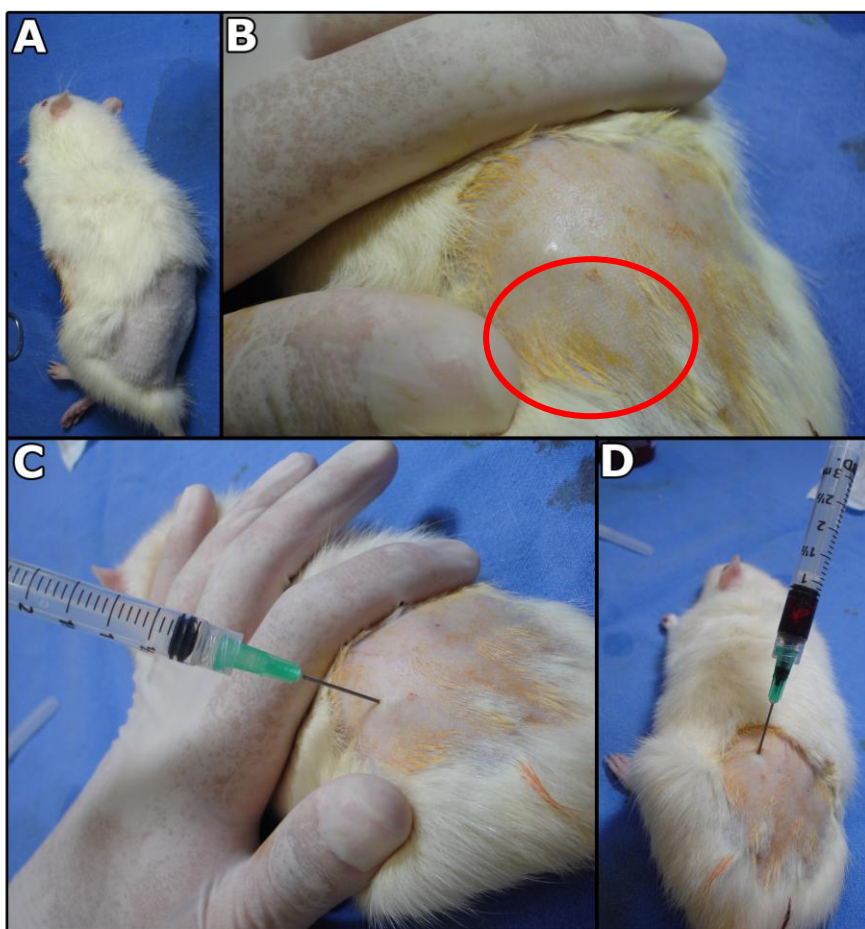


FIGURA 6 - Punção da Crista Ilíaca. Em A, anestesiou-se e foi feita a tricotomia da região dorsal da cobaia. Em B, após a antissepsia do local, localizou-se a crista ilíaca da cobaia. Em C, foi feita a inserção da agulha na crista ilíaca. Em D, com a agulha corretamente posicionada, realizou-se a aspiração da medula.

### 3.5.2 Isolamento das células mononucleares da medula óssea

Feita a punção, a medula coletada foi transferida para um frasco de 15ml e completado com solução de tampão fosfato tamponado (PBS) estéril até 10ml. Os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 1400 rpm. Após o término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante com uma pipeta, se completou até 7 ml com meio de cultura (DMEM) e a solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipete e pipetador. Então 7ml de solução foram transferidos para um tubo de 15 ml contendo 3ml de gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (densidade = 1.077 g/mL), tomando-se cuidado para que a solução não se misturasse com o Ficoll. O tubo heterogêneo foi centrifugado por 40 minutos a 1500 rpm. Depois de centrifugado, o anel característico deverá surgir na interfase do tubo (FIGURA 7), e com a ajuda de uma pipeta foi transferido o anel para outro tubo de 15 ml, completando-se até 10 ml com PBS estéril sendo centrifugado por cinco minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, com 1ml de PBS/Albumina 5%, ressuspendeu-se o pellet formado.

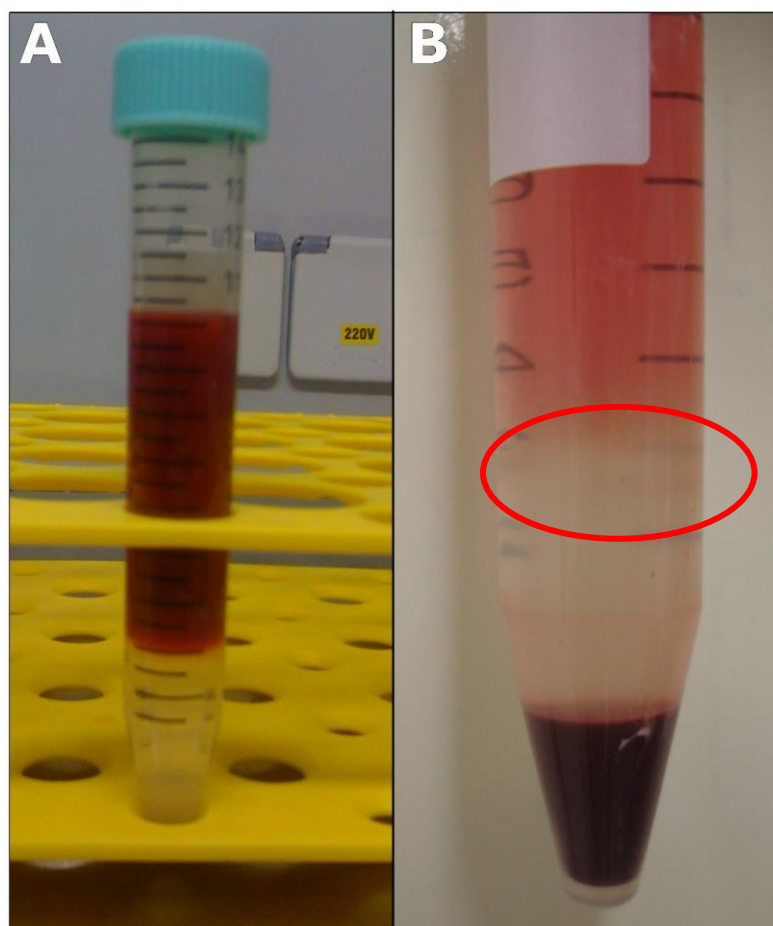


FIGURA 7 - Isolamento das Células Mononucleares. Em A, a solução com o gradiente de densidade Ficoll-Hypaque ( $d= 1.077 \text{ g/mL}$ ). Em B, o anel das células mononucleares formado após centrifugação com o gradiente de densidade.

Então foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer, e foi testada a viabilidade celular, utilizando o corante vital Azul de Tripán (FIGURA 8). Para isso homogeneizou 10µl do isolado de células em 10µl de Azul de Tripán, e com o auxílio de uma micropipeta preparou-se a câmara. Foram contados os quatros quadrantes excluindo as células coradas, então foi feito o calculo para determinar a concentração de células presente no tubo da solução inicial.



FIGURA 8 - Câmara de Neubauer. Contagem das células e identificação da viabilidade celular.

### 3.6 Imunofenotipagem

Para a imunofenotipagem foram utilizados tubos tipo falcon 12x75mm, para citometria, foram adicionados 100µl das células isoladas, mantidas em solução de PBS/Albumina 5%, totalizando 9 tubos por rata, sendo que para cada tubo, foi utilizado uma determinada configuração de anticorpos para uma identificação celular mais precisa(TABELA 2). Os anticorpos e o painel de anticorpos monoclonais serão mostrados nas tabelas 1 e 2 a seguir:

TABELA 2 – ANTICORPOS MONOCLONAIS

ANTICORPO	FLUOROCROMO	NOME ALTERNATIVO	CLONE	FUNÇÃO
<b>Controle isotípico IgG1</b>	FITC			
	FITC		A85-1	Anticorpo secundário utilizado para marcadores purificados sem fluorocromo.
<b>CD24</b>	PURIFICADO	Heat-Stable Antigen	HIS50	Marcador do estágio de desenvolvimentos da célula B.
<b>CD31</b>	PE	PECAM-1	TLD-3A12	Desempenha um papel importante na etapa de diapedese da emigração de linfócitos na inflamação.
<b>CD34</b>	ALEXA FLUOR	gp105-120		Adesão célula-célula, marcador de células-tronco hematopoiéticas.
<b>CD44H</b>	FITC	Pgp-1, H-CAM, CD44s	OX-49	Está envolvido na junção e na passagem de leucócitos pelas células endoteliais.
<b>CD45</b>	PE-CY 5	Leukocyte Common Antigen	OX-1	Essencial para as células T e B para ativação do receptor de antígenos
<b>CD54</b>	PE	ICAM-1	1A29	Reage com o CD11a/CD18 resultando em inflamação
<b>CD73</b>	PURIFICADO	Ecto-5'-nucleotidase	5F/B9	Mediador da adesão de linfócitos no endotélio
<b>CD90</b>	PE	Thy-1	OX-7	Contribui para a inibição da proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas
<b>CD106</b>	PE	VCAM-1	MR106	Realiza a adesão da célula leucócita-endotelial, juntamente com a transdução de sinal

TABELA 3 – PAINEL DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

TUBO	CONFIGURAÇÃO (FITC / PE / PE-Cy5 / Alexa-Fluor)
1	Controle Isotípico
2	Controle células
3 (Endoteliais)	** / CD31 / CD45 / CD34
4 (Precursora B/ Pró-B)	CD24 / CD90 / CD45 / CD34
5 (CTM)	CD44H/ CD54 / CD45 / CD34
7 (CTM)	CD73 / CD106 / CD45 / CD34
8 (BrdU)*	BrdU / ** / 7AA-D / **
9 (CTM BrdU)*	BrdU / CD106 / 7AA-D / CD34

NOTA: \*Tubos incubados separadamente, \*\*Não foi usado anticorpo para estes canais de fluorescência.

Primeiramente, os tubos 4 e 7 foram incubados, após a homogeneização no vortex, por 15 minutos na ausência de luz, com os anticorpos primários (CD24 e CD73). Foram, então, lavados com 400µl de PBS/Albumina 5% e centrifugados 1400rpm, 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com 100µl de PBS/Albumina 5%, e incubadas com o anticorpo conjugado (FITC Rat Anti-

Mouse IgG1 - 3µl), por 15 minutos e no escuro. Após a incubação as células foram lavadas com 400µl de PBS/Albumina 5%, centrifugadas (1400rpm, 5 minutos) descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células com 100µl PBS/Albumina 5%. Então, junto com os demais tubos, foram adicionados os anticorpos monoclonais que não necessitam de anticorpo conjugado, de acordo com a tabela 3, respeitando o tempo de incubação e a lavagem como já mostrado. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em 250µl de PBS/Albumina 5%, para que os tubos pudessem ser analisados no citometro de fluxo (FACSCalibur Becton Dickinson).

### 3.7 BrdU

Juntamente com a imunofenotipagem feita com anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas da membrana, foi feita uma marcação utilizando bromodeoxiuridina (BrdU), acompanhada da marcação com 7-amino-actinomomicina D (7-AAD). Com estes dois marcadores intracelulares foi possível analisar se as células adquiridas da punção, estavam sintetizando DNA (incorporação do BrdU) e inferir a posição do ciclo celular em que as células punccionadas estavam ( G0/1,S ou G2/M, definida pela intensidade do 7-AAD).

#### 3.7.1 Protocolo para a marcação com BrdU

Para a marcação com BrdU foi utilizado o *BrdU Flow Kit Staining Protocol* (BD Pharmingen™), sendo escolhida a opção 1 deste protocolo, no qual a incubação é feita no mesmo dia em que é feita a análise.

Em tubos devidamente identificados, foram adicionados 100µl da solução de células isoladas mantidas em PBS/ALBUMINA 5%, então se preparou a solução de BrdU diluído em meio de cultivo a uma concentração final de 1µM. Para isso foi necessário diluir o conteúdo do frasco do BrdU com meio de cultura. Então, transferiu-se 10µl dessa solução diluída para os tubos contendo as células, juntamente com mais um ml de meio de cultura. Essa solução de células, meio de cultura e BrdU, ficou em um período de *overnight* em uma estufa com temperatura controlada de 37°C e com concentração de CO<sub>2</sub> a 5% também controlada. Após o *overnight* os tubos foram centrifugados a 1500rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas com 50µl de *staining buffer* (PBS

mais 3% de Soro Fetal Bovino). Então foi feita a marcação com anticorpos específicos para proteínas da membrana (PE Mouse Anti-Rat CD106 e o CD34 Alexa Fluor® 405) e os tubos foram incubados por 15 minutos no gelo. Após a incubação, foi feita a primeira lavagem com um ml de *staining buffer* por tubo, estes foram homogeneizados e centrifugados a 1400rpm por cinco minutos, em centrifuga refrigerada. Feita a centrifugação foi retirado o sobrenadante, e as células foram ressuspendidas com 100µl do fixador *BD Cytotfix/Cytoperm Buffer*, homogeneizadas e foram incubadas por 20 minutos, no gelo. As células foram novamente lavadas, porém com a solução *BD Perm/Wash Buffer* (solução concentrada foi diluída a 1:10 em água deionizada). Os tubos que voltaram da centrifuga após a lavagem são refixados, porém utilizando 100µl de *BD Cytoperm Plus Buffer*, estes foram incubados por 10 minutos no gelo. Então foi feita uma nova lavagem, outra fixação e novamente uma lavagem. As células, então, foram ressuspendidas com 100µl de uma solução diluída de Dnase (300µl Dnase em 700µl de PBS), então os tubos foram incubados em estufa a 37<sup>0</sup>C, por uma hora. As células foram lavadas e após o descarte do sobrenadante foram ressuspendidas com 50µl solução diluída de *BD Perm/Wash Buffer* contendo o anticorpo Anti-BrdU FITC. Os tubos então foram incubados por 20 minutos. Após a incubação os tubos passaram por uma última lavagem e as células foram ressuspendidas com 20µl de 7-AAD. Incubou-se por 15 minutos e ao final foi adicionado 230µl da solução de *staining buffer*. Depois deste processo os tubos estavam aptos a serem adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur Becton Dickinson sob uma velocidade de leitura menor ou igual a 400 eventos/segundo.

## 4. RESULTADOS

Os testes estatísticos foram feitos no software *STATISTICA*, nele foram obtidos os dados e os gráficos. Para a análise dos eventos adquiridos do citômetro, foi usado o software *INFINICYT* (Cytognos, Espanha).

### 4.1 TSH

Primeiramente foram feitas as análises dos resultados dos exames de TSH, para determinar se houve diferença estatística. Usou-se o teste de Wilcoxon, já que se constatou que a distribuição das amostras não estavam na normalidade. Testou-se, então, a hipótese nula, na qual os valores de TSH antes da(s) cirurgia(s) seriam iguais aos valores de TSH após a(s) cirurgia(s). Foi feito o teste em todas as ratas de todos os grupos. Os resultados a seguir, apresentam: média, máximo, mínimo, desvio padrão e valores de  $p$  (FIGURAS 9 a 12). Os gráficos mostram os valores da primeira coleta, que foi feita antes das cirurgias, e após as cirurgias, sendo que no grupo controle foram também feitas duas coletas.

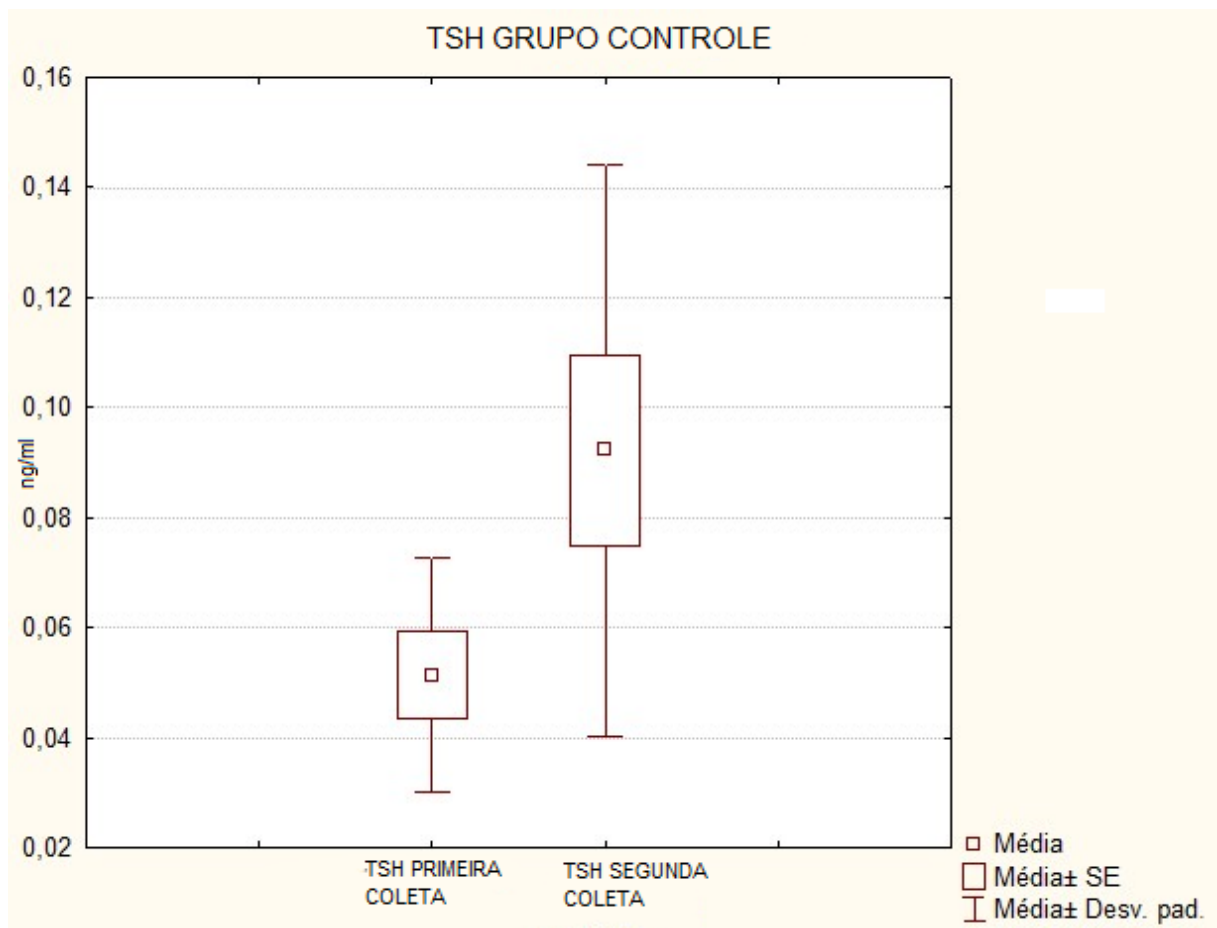


FIGURA 9: Valores de TSH do grupo controle.

TABELA 4 – VALORES DE TSH DO GRUPO CONTROLE

	<b>ANTES</b>	<b>DEPOIS</b>
<b>Média</b>	0,051429	0,092222
<b>Mínimo</b>	0,02	0,01
<b>Maximo</b>	0,09	0,19
<b>Desvio padrão</b>	0,021157	0,051908
<b><i>p</i> (<i>p</i>&lt;0,05)</b>	<b>0,142214</b>	

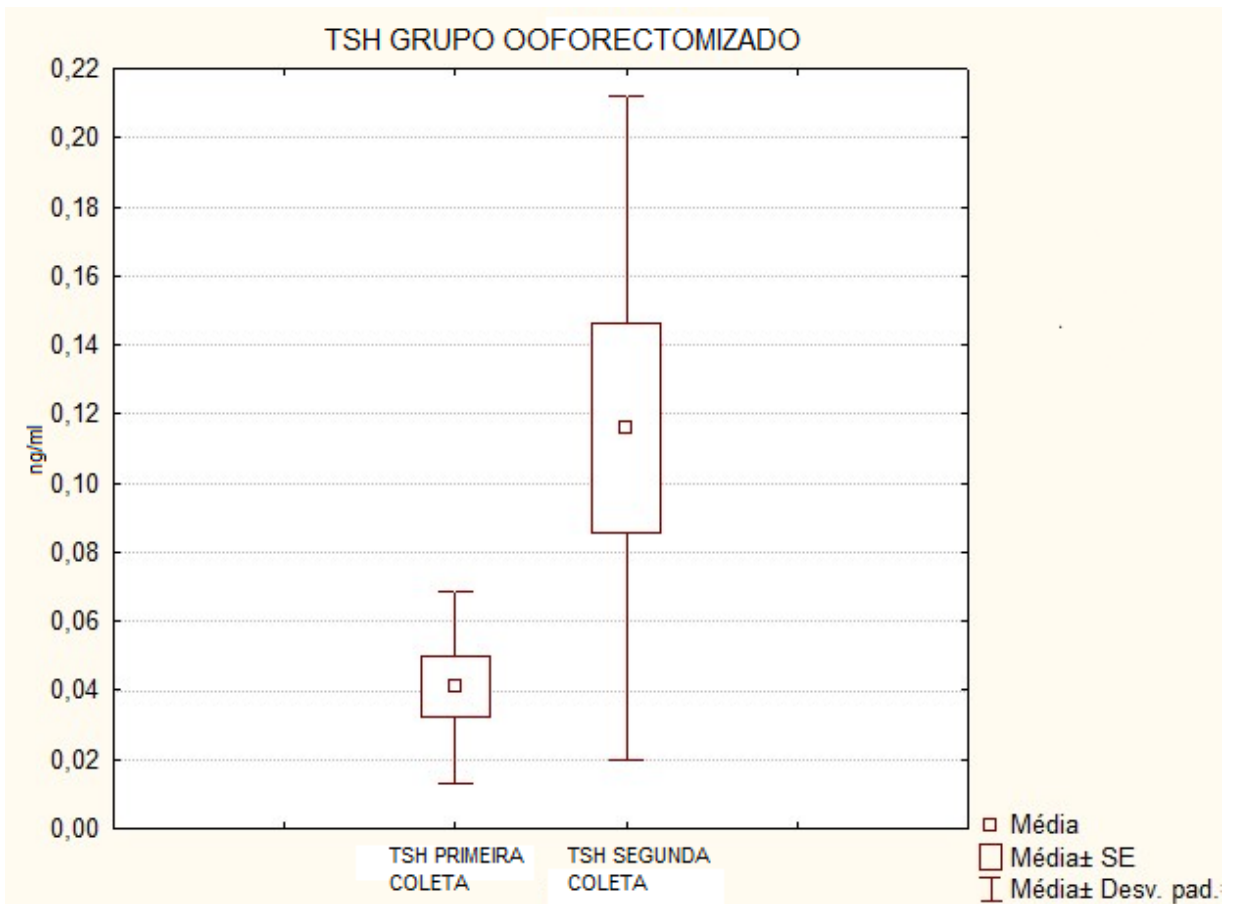


FIGURA 10: Valores de TSH do grupo ooforectomizado.

TABELA 5 – VALORES DE TSH DO GRUPO OOFORECTOMIZADO

	<b>ANTES</b>	<b>DEPOIS</b>
<b>Média</b>	0,041000	0,116000
<b>Mínimo</b>	0,02	0,03
<b>Maximo</b>	0,11	0,31
<b>Desvio Padrão</b>	0,027669	0,095940
<b><i>p</i> (<i>p</i>&lt;0,05)</b>		<b>0,011719</b>

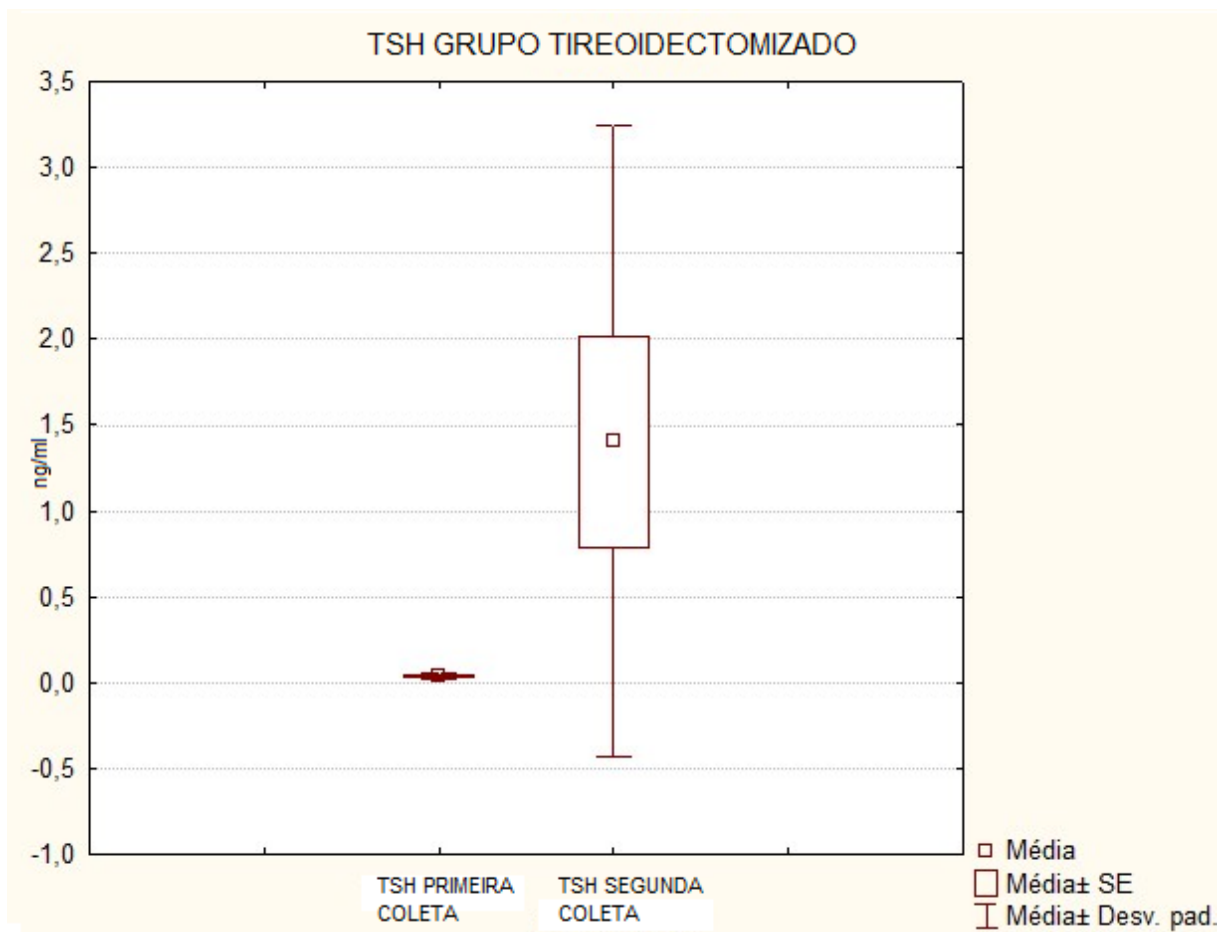


FIGURA 11: Valores de TSH do grupo tireoidectomizado.

TABELA 6 – VALORES DE TSH PARA O GRUPO TIREOIDECTOMIZADO

	<b>ANTES</b>	<b>DEPOIS</b>
<b>Média</b>	0,040000	1,403333
<b>Mínimo</b>	0,02	0,05
<b>Maximo</b>	0,09	5,16
<b>Desvio Padrão</b>	0,021082	1,837723
<b><i>p</i> (<i>p</i>&lt;0,05)</b>		<b>0,011719</b>

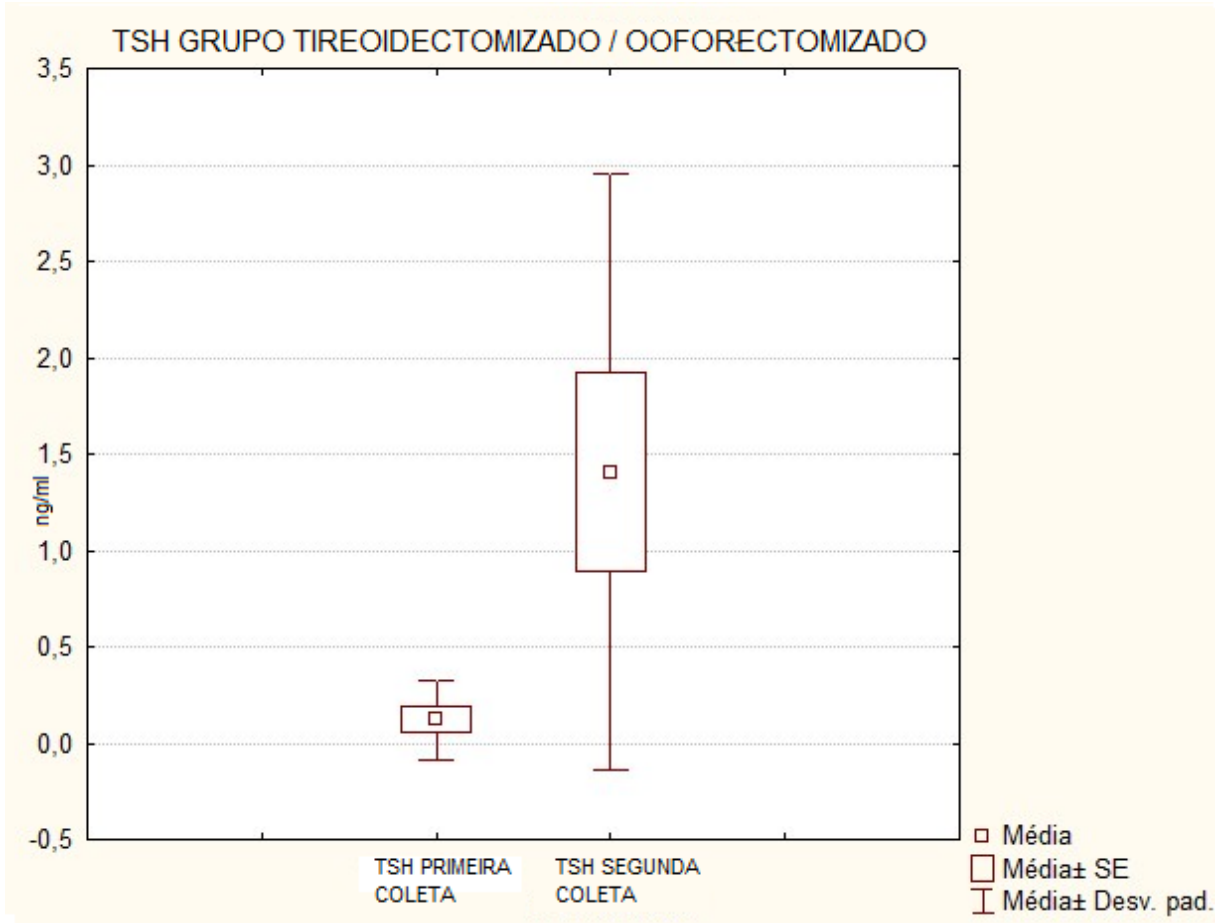


FIGURA 12: Valores de TSH do grupo Tireoidectomizado e Ooforectomizado.

TABELA 7 – VALORES DE TSH PARA O GRUPO TIREOIDECTOMIZADO E OOFORECTOMIZADO

	ANTES	DEPOIS
<b>Média</b>	0,122222	1,406667
<b>Mínimo</b>	0,03	0,06
<b>Maximo</b>	0,64	4,23
<b>Desvio Padrão</b>	0,207652	1,543033
<b><i>p</i> (<i>p</i>&lt;0,05)</b>	<b>0,035693</b>	

As ratas que sofreram tireoidectomia tiveram um aumento no valor do TSH (FIGURAS 11 e 12), indicando o hipotireoidismo. Houve também um aumento do valor de TSH encontrado nas ratas que foram somente ooforectomizadas, porém este aumento não foi tão grande quanto nas tireoidectomizadas, apesar de se obter uma diferença estatística significativa em relação ao valor anterior a cirurgia (FIGURA 10).

Para melhor visualização dos dados eles foram rearranjados na seguinte tabela, contendo a média da primeira coleta e da segunda coleta do TSH de todos os grupos e o valor de  $p$  para cada grupo:

TABELA 8 – VALORES DA MÉDIA DO TSH ANTES E DEPOIS

GRUPOS	MÉDIA TSH ANTES	MÉDIA TSH DEPOIS	$p(p<0,05)$
<b>C</b>	0,051429	0,092222	0,142214
<b>T</b>	0,040000	1,403333	0,011719
<b>O</b>	0,041000	0,116000	0,011719
<b>T+O</b>	0,122222	1,406667	0,035693

#### 4.2 Citometria de Fluxo: Análise Imunofenotípica e Estatística

Nos quatro grupos do experimento, foram feitos no total oito tubos, sendo dois deles controle isotópico e controle de células. No restante dos tubos foram incubados com marcadores sendo estes para identificar algumas das células da medula óssea. No citômetro FACSCalibur Becton Dickinson foi adquirido um total de 150.000 eventos para cada tubo. Para melhor visualização dos dados, eles foram arranjados em histogramas separados por grupo e tabelas com valores das médias encontradas, máximo e mínimo e o desvio padrão.

Para a análise estatística dos resultados encontrados para cada tubo, foi feito o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) comparando todos os quatro grupos para verificar se a porcentagem adquirida dos grupos por tubo é estatisticamente diferente. Junto com o teste de K-W foi feito também o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (M-W), no qual os grupos que sofreram cirurgia foram comparados com o grupo controle. Os gráficos não foram mostrados, apenas o valor de  $p$  nas tabelas dos respectivos tubos. Foi adotada a hipótese nula na qual não há diferença entre os grupos e a hipótese alternativa na qual existe uma diferença nos grupos; para tal o valor  $p<0,05$  tem que ser constatado.

Foi utilizada novamente a seguinte abreviação nas tabelas e figuras a seguir: **T+O** para o grupo tireoidectomizado e ooforectomizado, **T** para o grupo tireoidectomizado, **O** para o grupo ooforectomizado e **C** para o grupo controle.

TABELA 9 - PORCENTAGEM DE CÉLULA ENDOTELIAL

	T+O	T	O	C
<b>Média</b>	0,65%	0,48%	0,23%	0,25%
<b>Mínimo</b>	0,31%	0,25%	0,10%	0,10%
<b>Máximo</b>	1,20%	1,07%	0,35%	0,42%
<b>Desvio Padrão</b>	0,36%	0,25%	0,08%	0,11%

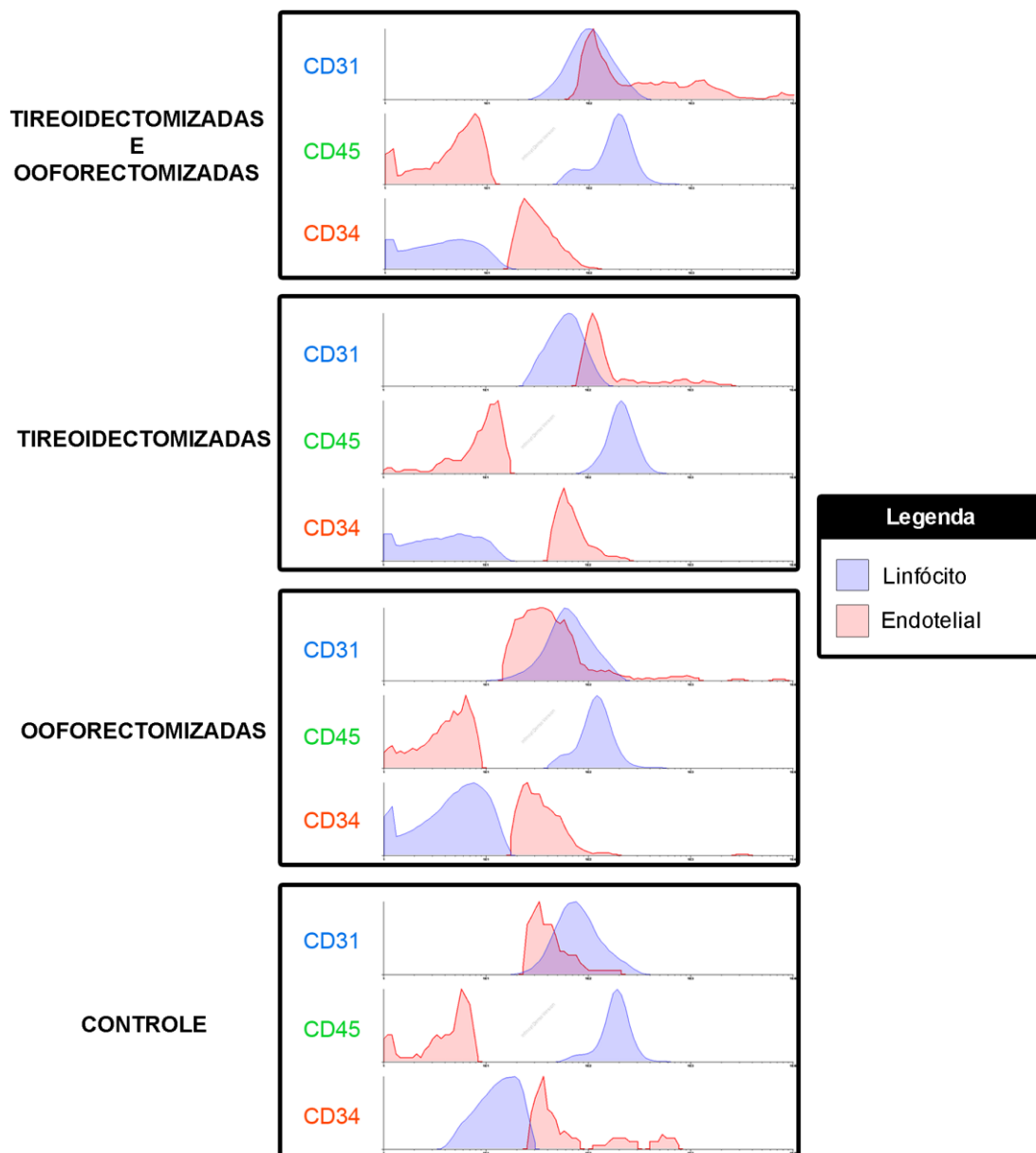


FIGURA 13: Histograma dos grupos referente a célula endotelial que está sendo caracterizada pelo fenótipo CD31+, CD45 – e CD34 +.

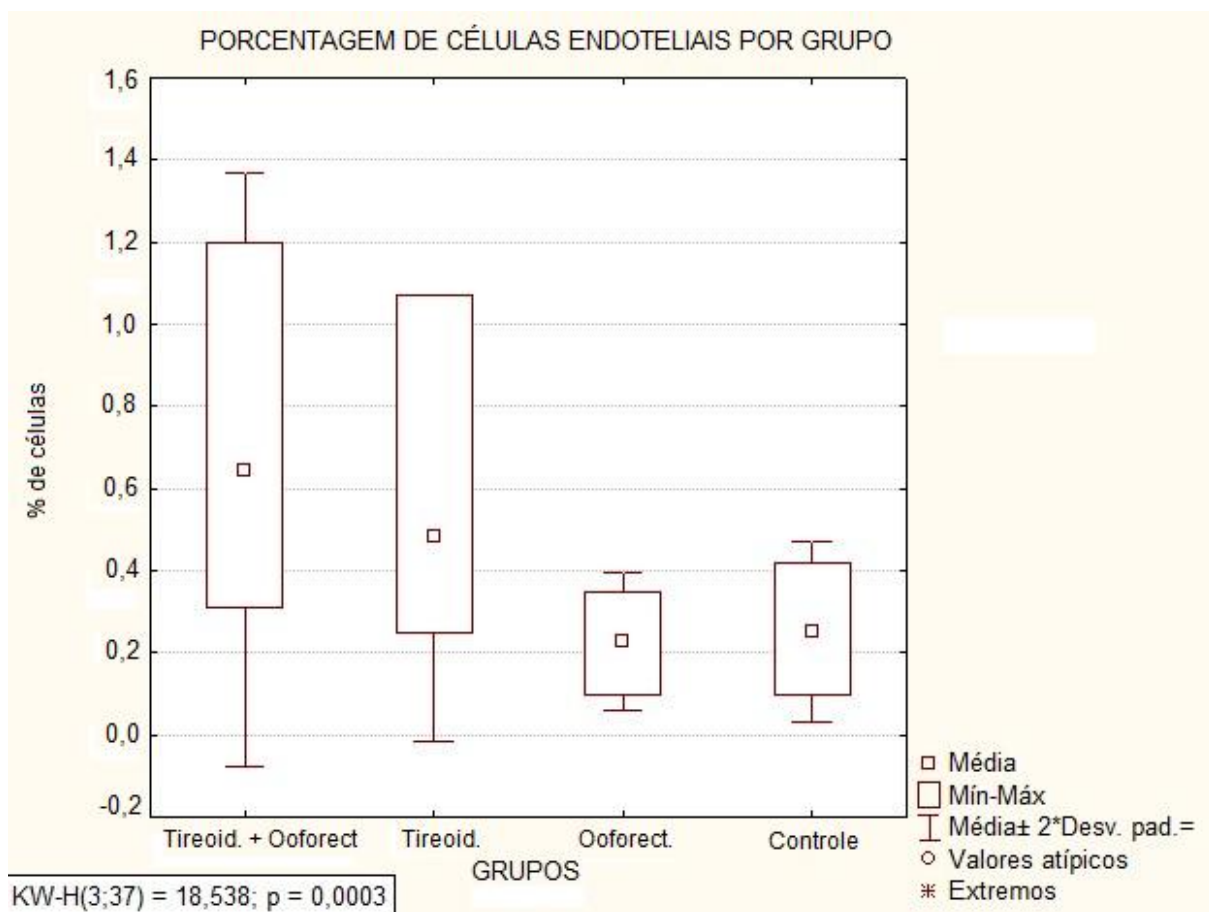


FIGURA 14: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente a célula endotelial. Para o teste de K-W, o valor de  $p$  obtido foi de 0,0003, com isso é possível afirmar que pelo menos um dos quatro grupos é diferente dos demais.

TABELA 10 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUBO 3 (CÉLULA ENDOTELIAL)

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
<b>T+O x C</b>	0,005129
<b>T x C</b>	0,010113
<b>O x C</b>	0,850107

NOTA: Juntamente com o teste de K-W foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, se verificou que os grupos tireoidectomizados/ooforectomizados e tireoidectomizados obtiveram um valor  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese alternativa é aceita, na qual, há diferença estatística desse grupo em relação ao controle.

TABELA 11 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS PRECURSORA B/PRÓ-B

	T+O	T	O	C
<b>Média</b>	7,04%	3,87%	15,46%	5,48%
<b>Minimo</b>	2,50%	1,54%	5,53%	0,23%
<b>Máximo</b>	16,82%	9,89%	26,57%	16,78%
<b>Desvio Padrão</b>	4,72%	3,29%	6,80%	4,79%

FIGURA 15: Histograma dos grupos referente às células precursora B / pró-B. Estas estão sendo caracterizadas pelo fenótipo CD24 + CD90 + CD45 + CD34 +.

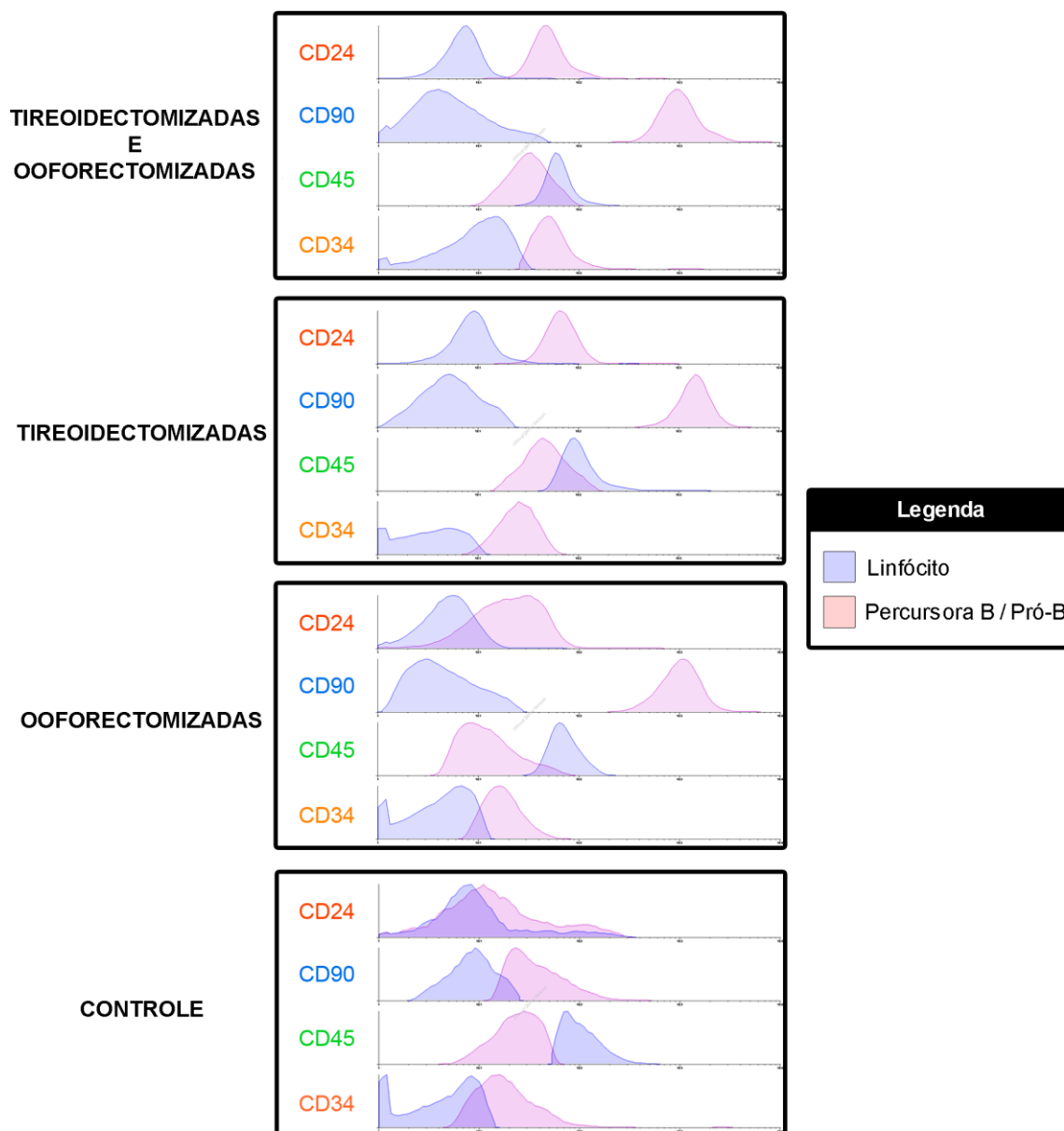


FIGURA 15: Histograma dos grupos para o tubo 4 referente as células precursora B / pró-B. Estas estão sendo caracterizadas pelo fenótipo CD24 + CD90 + CD45 + CD34 +.

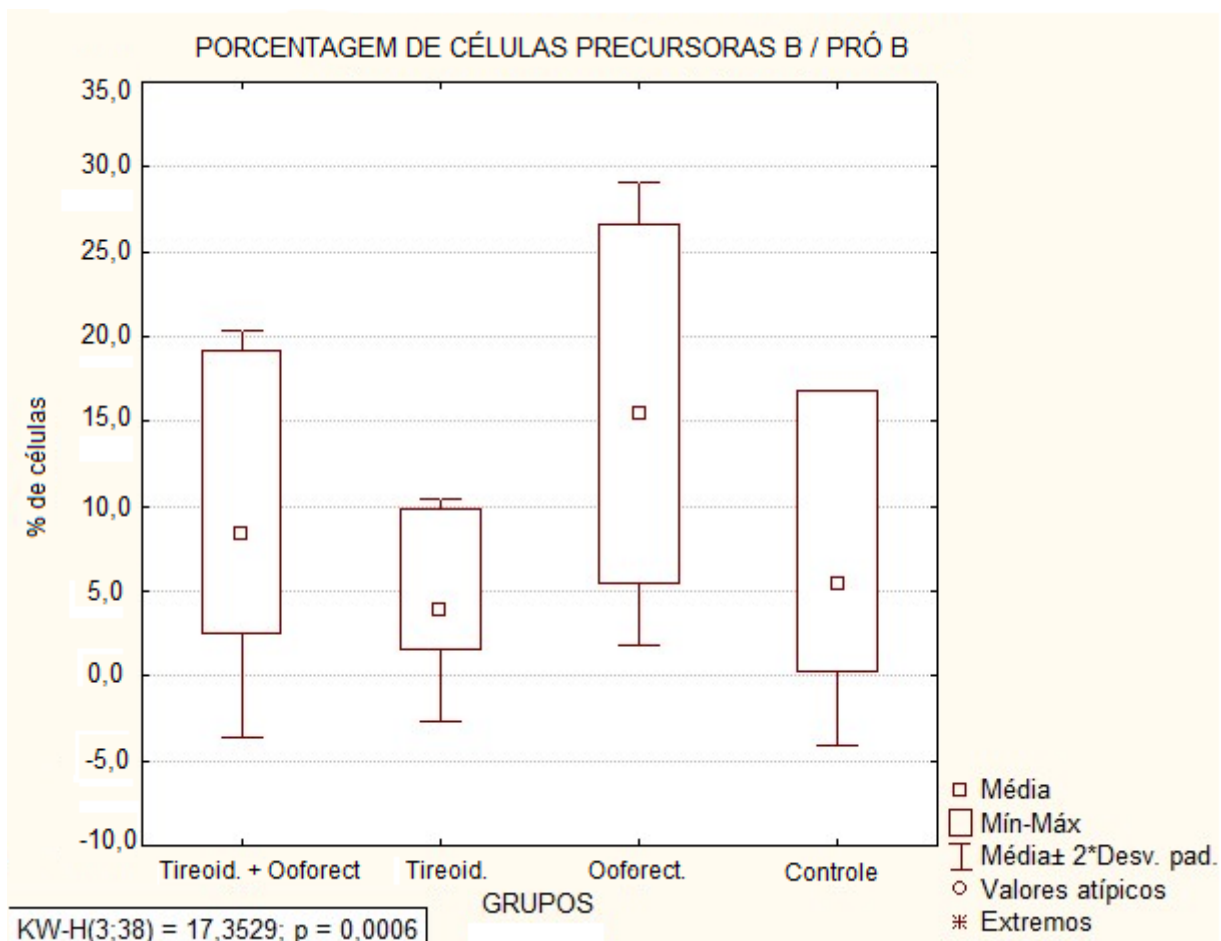


FIGURA 16: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente às células precursora B / pró-B. Para o teste de K-W, o valor de  $p$  obtido foi de 0,0006, com isso é possível afirmar que pelo menos um dos quatro grupos é diferente dos demais.

TABELA 12 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUBO 4 (CÉLULA PRECURSORA B/PRÓ-B)

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
T+O x C	0,270345
T x C	0,307435
O x C	0,002202

NOTA: Juntamente com o teste de K-W, foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, se verificou o grupo ooforectomizado obteve um valor de  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese alternativa é aceita, na qual, há diferença estatística desse grupo em relação ao controle.

TABELA 13 - PORCENTAGEM DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL

	T+O	T	O	C
<b>Média</b>	1,15%	0,36%	0,40%	0,55%
<b>Mínimo</b>	0,35%	0,09%	0,21%	0,05%
<b>Máximo</b>	2,83%	1,08%	0,63%	2,04%
<b>Desvio Padrão</b>	0,90%	0,30%	0,14%	0,68%

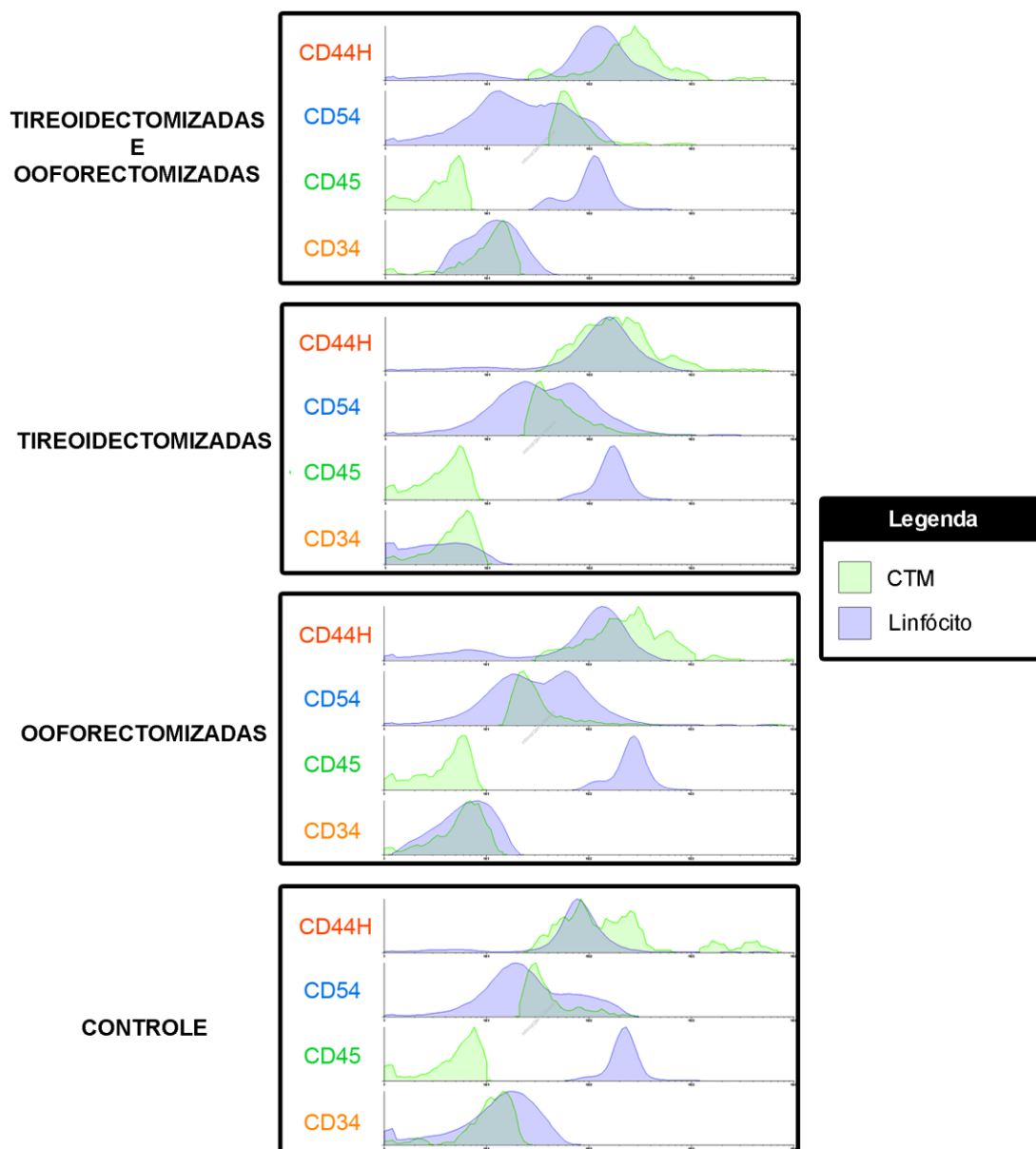


FIGURA 17: Histograma dos grupos referente à célula-tronco mesenquimal. Esta está sendo caracterizada pelo fenótipo CD44H ++ CD54 + CD45 – CD34 -.

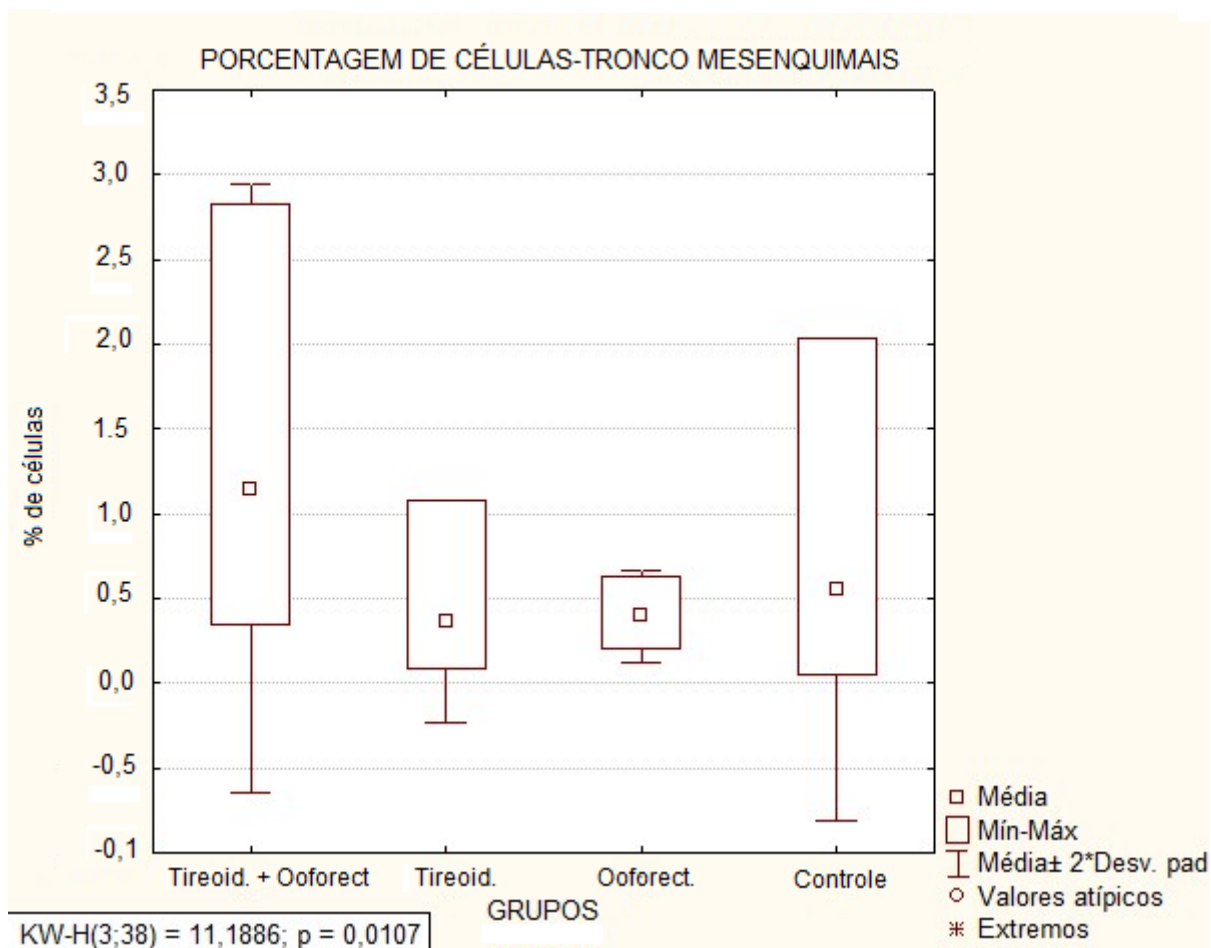


FIGURA 18: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente à CTM (primeiro tubo). Para o teste de K-W, o valor de  $p$  obtido foi de 0,0107, com isso pode-se afirmar que em pelo menos um dos quatro grupos é diferente dos demais.

TABELA 14 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUBO 5 (CTM)

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
T+O x C	0,022244
T x C	1,000000
O x C	0,384674

NOTA: Juntamente com o teste de K-W, juntamente com o teste de K-W, foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, se verificou o grupo tireoidectomizado/ooforectomizado obteve um valor de  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese alternativa é aceita, na qual, há diferença estatística desse grupo em relação ao controle.

TABELA 15 - PORCENTAGEM DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL

	T+O	T	O	C
<b>Média</b>	0,24%	0,09%	0,02%	0,06%
<b>Mínimo</b>	0,12%	0,03%	0,01%	0,01%
<b>Máximo</b>	0,49%	0,20%	0,03%	0,22%
<b>Desvio Padrão</b>	0,14%	0,05%	0,01%	0,06%

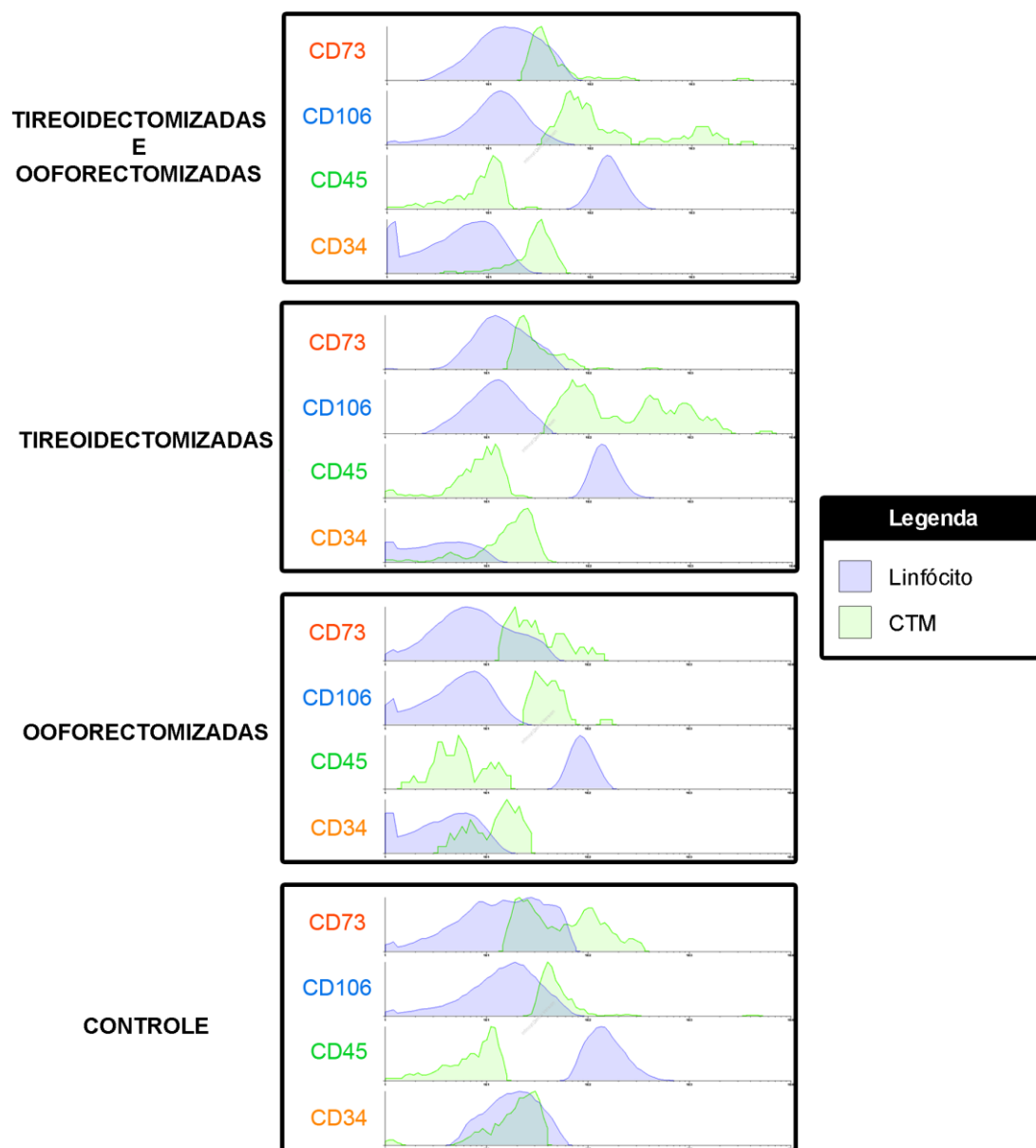


FIGURA 19: Histograma dos grupos referente à célula-tronco mesenquimal. Esta está sendo caracterizada pelo fenótipo CD73+ CD106 + CD45 – CD34 -.

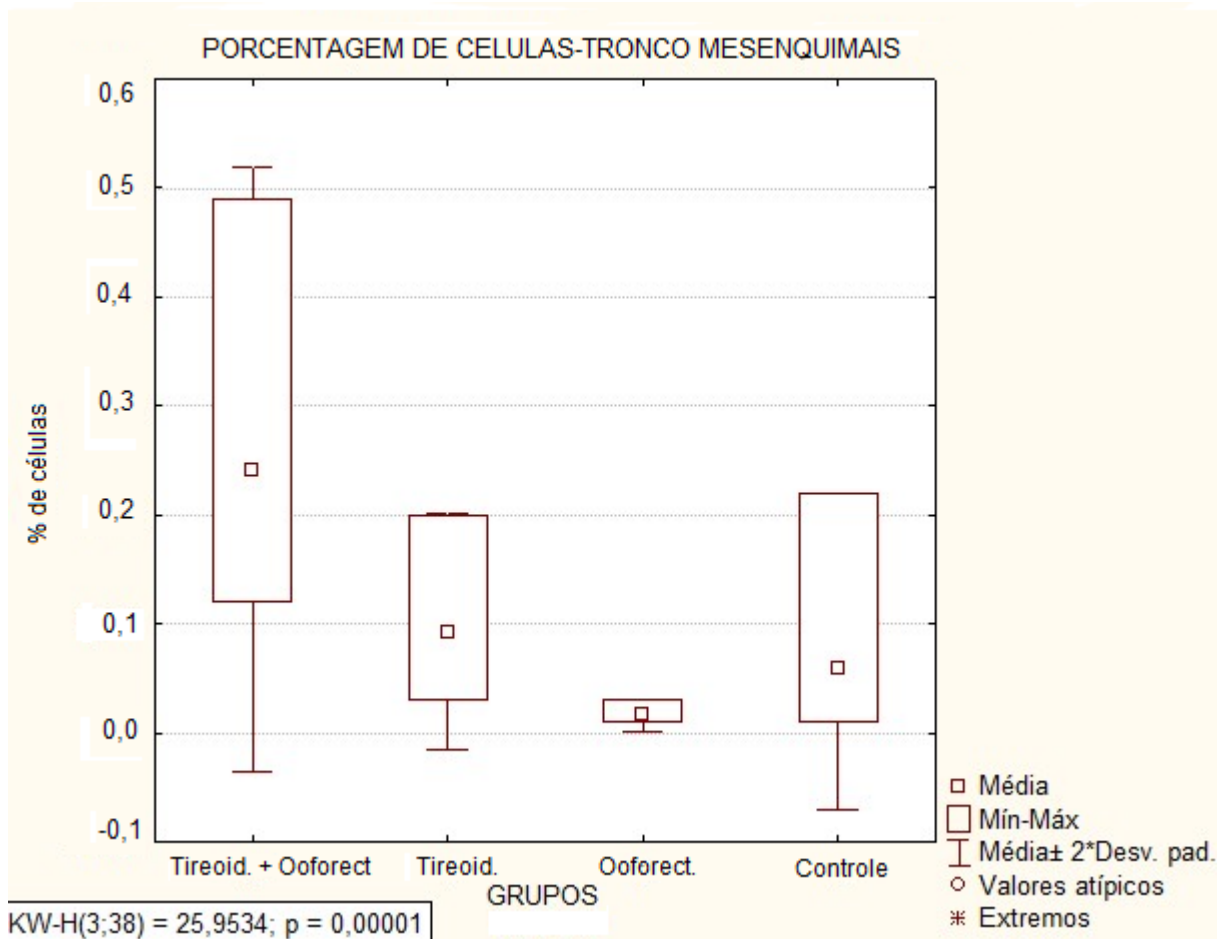


FIGURA 20: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente à CTM (segundo tubo). Para o teste de K-W, o valor de  $p$  obtido foi de 0,00001, com isso pode-se afirmar que em pelo menos um dos quatro grupos é diferente dos demais.

TABELA 16 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUBO 7 (CTM)

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
T+O x C	0,001234
T x C	0,079180
O x C	0,000670

NOTA: Juntamente com o teste de K-W foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, se verificou o grupo tireoidectomizado/ooforectomizado e ooforectomizado obtiveram um valor de  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese alternativa é aceita, na qual, há diferença estatística desses grupos em relação ao controle.

Para a análise das células em fase S do ciclo celular, foi feita a separação das fases de acordo com a expressão do BrdU e do 7-AAD. A fase S é caracterizada pela síntese de DNA, portanto as células que estavam em estado de proliferação acabaram incorporando o BrdU do meio, e este foi marcado pelo anticorpo específico que continha fluorescência, sendo possível então quantificar as células em estado de proliferação, como mostrado no *dotplot* abaixo:

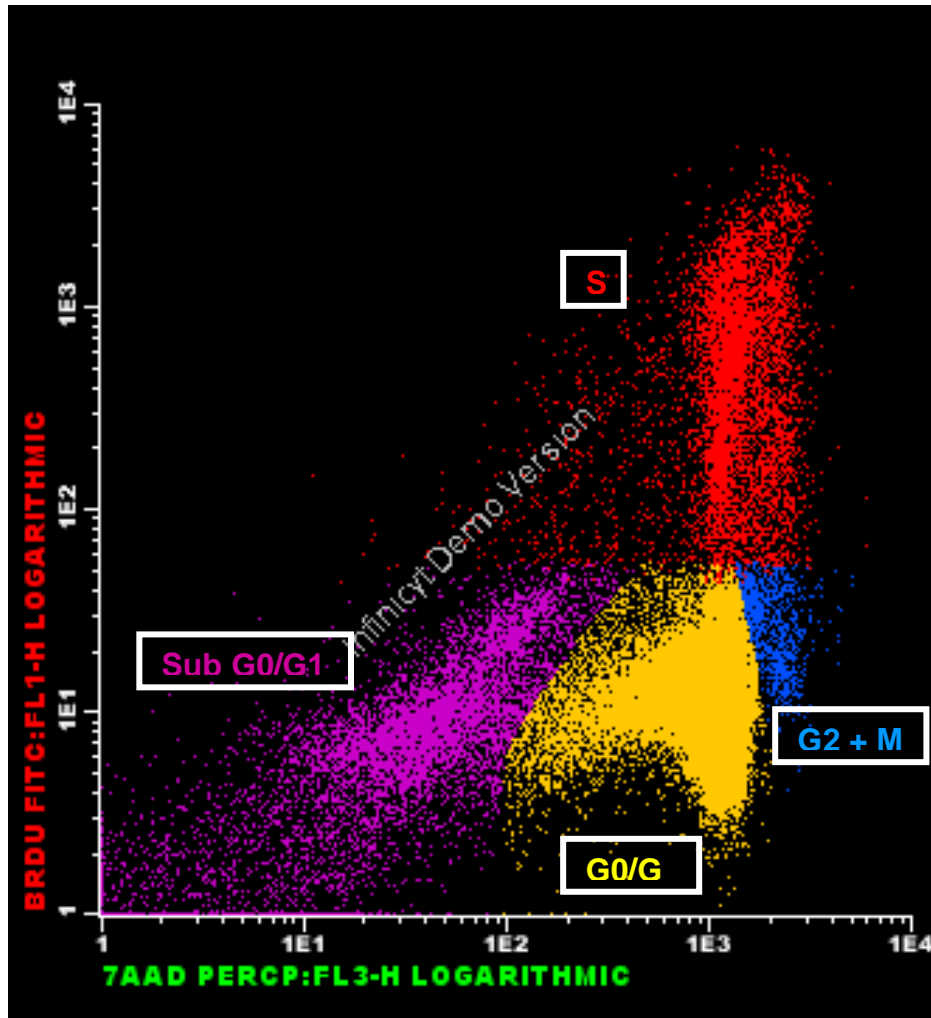


FIGURA 21: *Dotplot* do tubo com BrdU para a análise do ciclo celular .

TABELA 17 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS COM INCORPORAÇÃO DO BrdU

	T+O	T	O	C
<b>Média</b>	7,74%	6,40%	7,25%	5,49%
<b>Minimo</b>	3,21%	0,13%	0,21%	2,95%
<b>Máximo</b>	12,40%	9,02%	15,14%	8,25%
<b>Desvio Padrão</b>	3,62%	2,84%	6,21%	1,90%

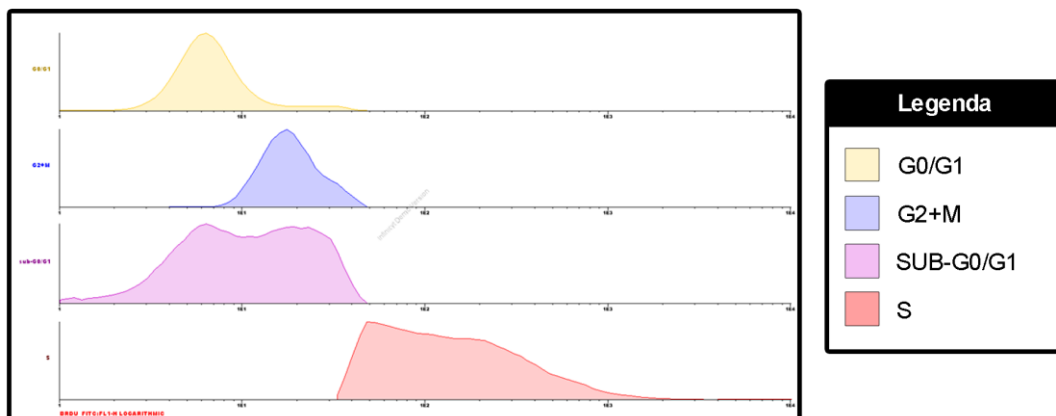


FIGURA 22: Histograma do tubo BrdU do total de células da medula óssea. Foi apresentado somente o histograma do grupo controle, pois não houve diferença entre os grupos. As curvas estão arranjadas de acordo com a positividade do BrdU.

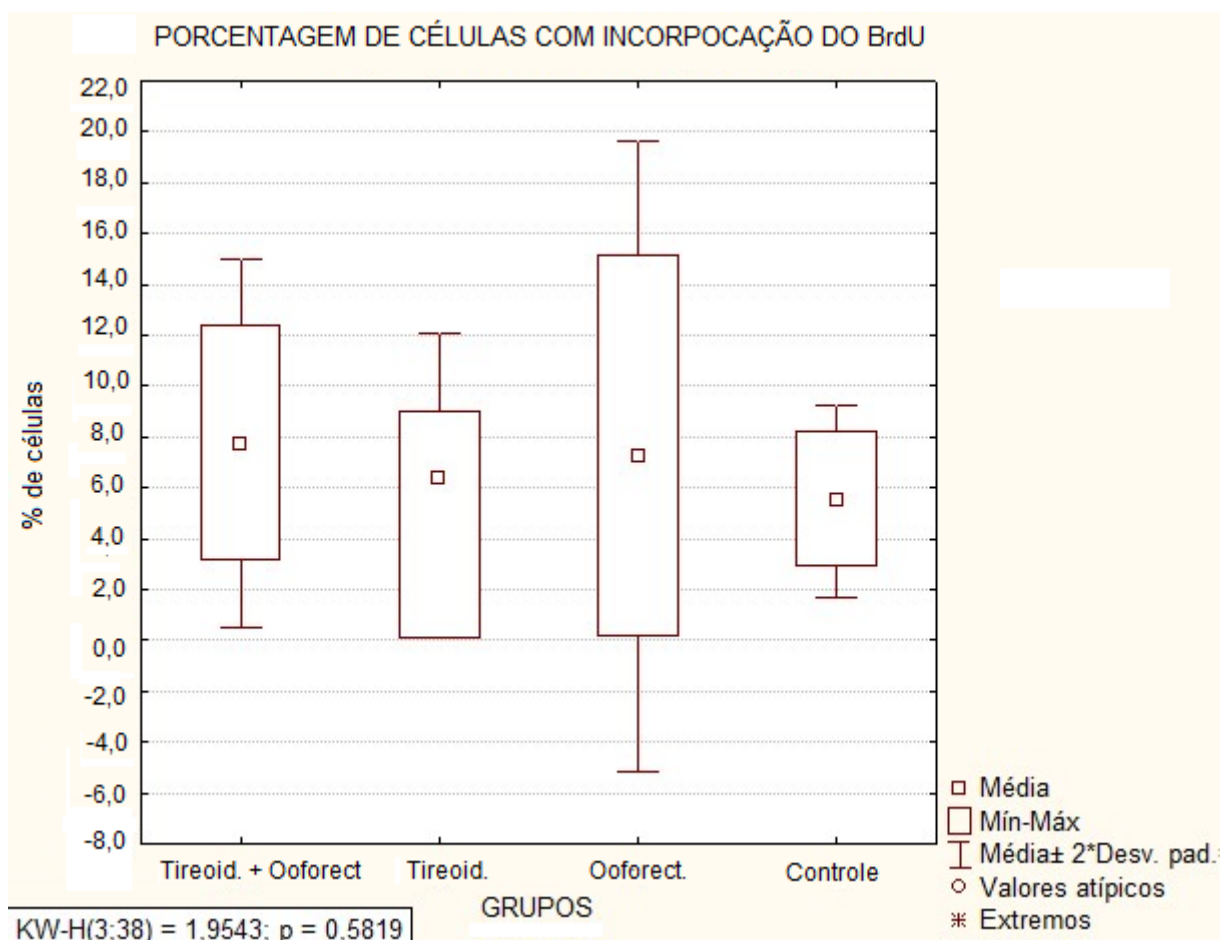


FIGURA 23: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente ao tubo BrdU. Para o teste de K-W, o valor de  $p$  obtido foi de 0,5819, com isso pode-se afirmar que não há diferença em estatística em nenhum dos grupos.

TABELA 18 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUBO BrdU

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
T+O x C	0,243
T x C	0,278
O x C	0,529

NOTA: Juntamente com o teste de K-W foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, nenhum dos grupos obteve um valor de  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese nula é aceita, na qual, não há diferença estatística desses grupos em relação ao controle.

TABELA 19 - PORCENTAGEM DE CTM COM INCORPORAÇÃO DO BrdU

	<b>T+O</b>	<b>T</b>	<b>O</b>	<b>C</b>
<b>Média</b>	0,50%	0,13%	0,18%	0,21%
<b>Minimo</b>	0,11%	0,04%	0,04%	0,03%
<b>Máximo</b>	1,56%	0,31%	0,67%	0,85%
<b>Desvio Padrão</b>	0,46%	0,10%	0,21%	0,24%

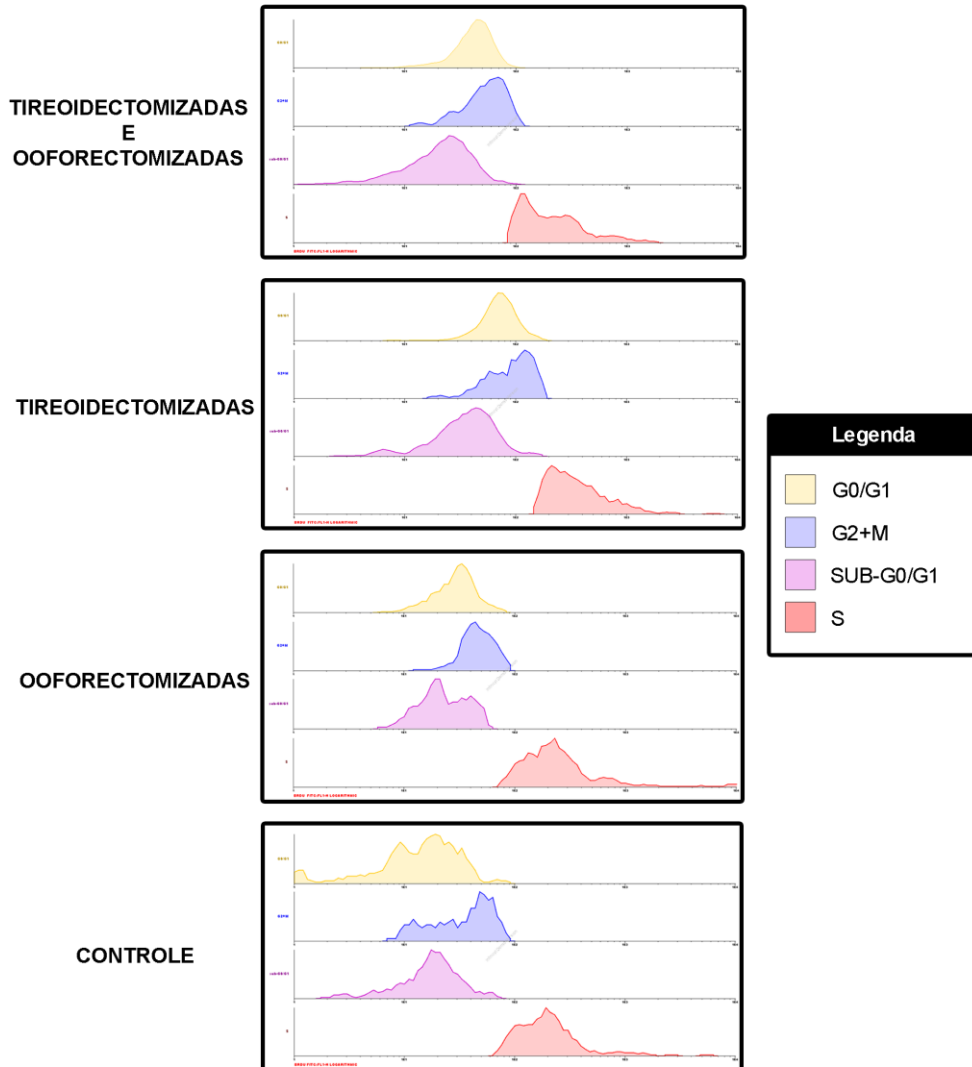


FIGURA 24: Histograma do tubo BrdU para identificação da atividade proliferativa das CTM que está sendo caracterizada pelo fenótipo CD106 + e CD34 -. A identificação do estado proliferativo através da positividade do BrdU.

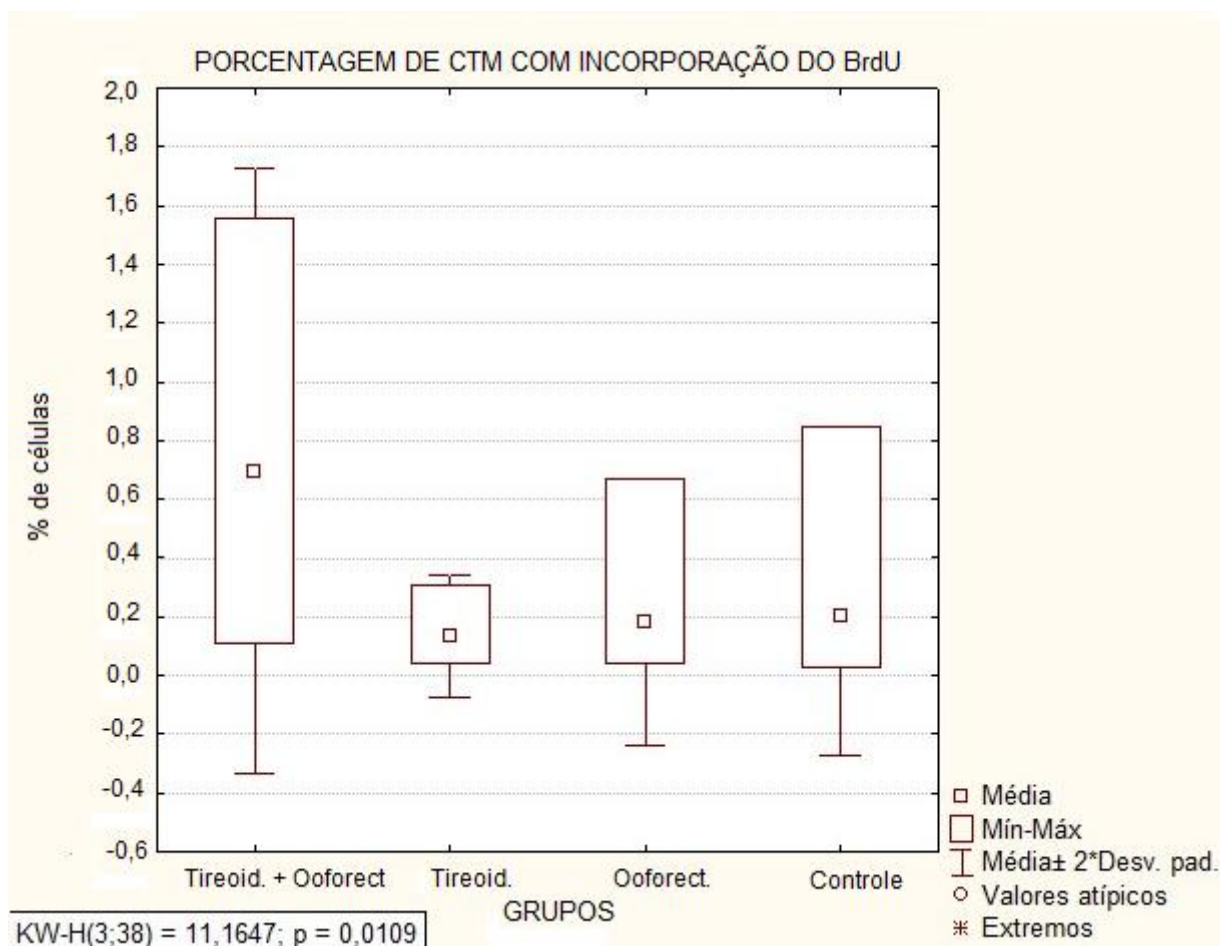


FIGURA 25: Teste de estatístico de Kruskal-Wallis referente ao tubo BrdU para identificação do estado proliferativo das CTM. Para o teste de K-W o valor de  $p$  obtido foi de 0,0109, com isso pode-se afirmar há diferença em pelo menos um dos grupos entre a porcentagem de células em proliferação.

TABELA 20 - TESTE DE MANN-WHITNEY PARA O TUDO BrdU CTM

GRUPOS	VALOR DE $p$ ( $p < 0,05$ )
T+O x C	0,065
T x C	0,968
O x C	1,000

NOTA: Juntamente com o teste de K-W foi feito também o teste de Mann-Whitney, no qual, nenhum dos grupos obteve um valor de  $p$  menor que 0,05. Portanto, a hipótese nula é aceita, na qual, não há diferença estatística desses grupos em relação ao controle.

As células endoteliais sofreram um aumento nos grupos tireoidectomizados/ooforectomizados quando comparados com o grupo controle, o grupo tireoidectomizado também teve um aumento na porcentagem de suas células, somente o grupo ooforectomizado não obteve mudança significativa porcentagem de suas células endoteliais (FIGURA 14 e TABELA 10).

As células precursoras/pré-B, sofreram um grande aumento na sua porcentagem no grupo ooforectomizado chegando a ficar com o dobro da população

quando comparadas as médias entre o grupo e o controle. Já no grupo tireoidectomizado não houve diferença estatística no resultado quando comparado com o grupo controle. Em relação ao grupo tireoidectomizados/ooforectomizados também não houve mudança estatística no resultado.

No primeiro de célula tronco mesenquimal (CTM), o grupo tireoidectomizados/ooforectomizados obteve um aumento estatisticamente significativo das CTM quando comparado com o controle, diferentemente os outros dois grupos em que a porcentagem de células mesenquimais não obteve diferença estatística significativa.

O mesmo ocorreu no segundo tubo de CTM, no qual o grupo tireoidectomizados/ooforectomizados teve sua porcentagem de CTM aumentada significativamente em relação ao grupo controle. Entretanto, neste tubo, houve uma diferença significativa no grupo ooforectomizado, porém na diminuição da porcentagem de células em relação ao grupo controle (FIGURA 18 e 20).

Com os marcadores utilizados para o tubo de célula endotelial podemos sugerir que devido à positividade do CD31 e CD34 e negatividade do CD45 esta célula é endotelial. O mesmo ocorre para o tubo BrdU CTM para identificação dessas células em fase de proliferação, onde foi usado apenas o CD106 e o CD34 para tal identificação celular, sendo o CD106 positivo e o CD34 negativo para a CTM.

TABELA 21 – RESUMO DOS RESULTADOS

	<b>T+O</b>	<b>T</b>	<b>O</b>	<b>C</b>
<b>Média TSH antes</b>	0,122222	0,040000	0,041000	0,051429
<b>Média TSH depois</b>	1,406667	1,403333	0,116000	0,092222
<b>Célula endotelial</b>	0,42%	0,48%	0,23%	0,25%
<b>Cél. Precursora B/ Pré-B</b>	7,04%	3,87%	15,46%	5,48%
<b>CTM Tubo 5 (CD44H e CD54)</b>	1,15%	0,36%	0,40%	0,55%
<b>CTM Tubo 7 (CD73 e CD106)</b>	0,24%	0,09%	0,02%	0,06%
<b>BrdU</b>	7,74%	6,40%	7,25%	5,49%
<b>BrdU CTM</b>	0,50%	0,13%	0,18%	0,21%

## 5. DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos e ovarianos estão diretamente ligados na alteração da porcentagem das células mononucleares derivadas da medula óssea, portanto se há uma alteração significativa na concentração dos mesmos, haverá um reflexo deste padrão na porcentagem das células presentes na medula óssea. Algumas alterações foram observadas na quantidade de células das diversas populações presentes na medula óssea dos grupos.

Alguns experimentos utilizam a reposição de estrógeno em ratas ooforectomizadas, com isso, ocorre um aumento na angiogênese e na quantidade de células mononucleares quando comparadas com ratas sem a reposição. Este fato foi constatado por Chen e colaboradores (2009), que separaram quatro grupos de ratas lesionadas no miocárdio: um controle e três ooforectomizadas. Destes três grupos dois receberam reposição de estradiol benzoado em concentrações diferentes, um em concentração fisiológica (0,1 mg/kg) e o outro com uma alta concentração (1 mg/kg). As ratas com reposição hormonal acabaram tendo uma melhor recuperação da lesão no miocárdio, sendo que o grupo com alta concentração do hormônio obteve a maior taxa de células CD34+ no sangue periférico, este mesmo grupo obteve a maior taxa dessas mesmas células no miocárdio, o que indica que o estrógeno promove a mobilização de células CD34+ para o sangue periférico em situação de infarto no miocárdio (CHEN *et al.*, 2009). Os dados mostram que o grupo ooforectomizado, obteve uma taxa de células endoteliais, na medula-óssea, equivalente ao grupo controle. Já o grupo tireoidectomizado/ooforectomizado e o grupo tireoidectomizado estavam com uma porcentagem de células endoteliais na medula-óssea maior que o grupo controle, sendo assim, podemos pensar que a condição de hipotireoidismo aumenta a necessidade do número de células endoteliais no organismo, mesmo este não tendo uma lesão, como no trabalho de Chen e colaboradores (2009). Podemos avaliar duas alternativas, a primeira seria que, com a remoção da glândula tireóide, haveria uma necessidade de aumentar a produção de células endoteliais para reparo ou reestruturação da própria glândula ou que a tireóide tenha com a produção do hormônio da tireóide, papel fundamental na regulação da proliferação das células endoteliais, explicando porque de indivíduos com hipotireoidismo não compensado

tenham maior risco para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas pelo aumento de células endoteliais na corrente sanguínea (ZENOVICH *et al.*, 2009).

Houve um aumento significativo nas células do tubo quatro (precursoras/pré-B) nos grupos ooforectomizados (FIGURA 16 e TABELA 11), que de acordo com Erben e colaboradores (1998) e Masuzawa e colaboradores (1994), a falta do estrógeno em cobaias ovariectomizadas, desencadeia um aumento na população das células linhagem B. No presente trabalho o enfoque foi mais precisamente nas células precursoras B e pré-B, onde o CD90 é bem expressado chegando a  $10^3$ , juntamente com o CD34 que chega a quase  $10^2$  (FIGURA 15), comprovando que a célula é imatura, o CD24 sugere que a célula é da linhagem B e os marcadores CD45 e CD34 qualificam-na linhagem hematopoiética. Erben e colaboradores (1998) fizeram sua pesquisa usando ratas de três meses da linhagem Fisher, constatou que, além das células da linhagem B, houve um aumento nas células positivas para OX-7(clone do CD90) em suas ratas ooforectomizadas, mostrando que o estrógeno atua também em níveis mais basais da linfopoiese, no caso, a precursora hematopoiética. Em contrapartida o grupo tireoidectomizado/ooforectomizado e o grupo tireoidectomizado obtiveram uma porcentagem nula em seus resultados (FIGURA 16 e TABELA 12). O trabalho feito em camundongos por Foster e colaboradores (1999), mostrou que camundongos com hipotireoidismo sofrem um decréscimo na sua taxa de linfopoiese da linhagem B. Como dito anteriormente, o do presente trabalho teve como foco as células precursoras B e as células pré-B. A célula B madura não foi analisada, talvez por essa razão, o resultado em relação ao grupo com deficiência dos hormônios tireoidianos não foi estatisticamente diferente quando comparado com o controle, mas mesmo assim, observa-se uma tendência de decréscimo na porcentagem média de células, tanto no grupo tireoidectomizado quanto no grupo ooforectomizado/tireoidectomizado. E que o estrógeno, quando comparado as células precursoras B e pré-B, atua com mais impacto quando comparado com os hormônios tireoidianos.

Em relação as células tronco mesenquimais (CTM), foram feitos dois tubos para a identificação da porcentagem dessas células na medula óssea, nestes, as ratas ooforectomizadas/tireoidectomizadas obtiveram uma maior porcentagem de células em relação ao controle, já no tubo sete além do aumento do número de célula das tireoidectomizadas/ooforectomizadas as ratas ooforectomizadas tiveram uma diminuição na porcentagem total de células.

No estudo de Ayaloglu-Butun e colaboradores (2011), foi visto que em cultura, o estrógeno aumenta a proliferação das células da colônia, aumenta a concentração das proteínas anti-apoptóticas *Bcl-2* e *Bcl-x<sub>L</sub>*, portanto, ajudam a manter as CTM em cultivo. Na ausência do estrógeno, há uma possibilidade maior de apoptose nas CTM, no presente trabalho foi observado que o grupo ooforectomizado obteve no segundo tubo para CTM, uma diminuição na porcentagem destas células em relação ao controle. Diferentemente do que ocorreu no grupo tireoidectomizado/ooforectomizado, onde em ambos os tubos, cinco e sete, houve um aumento nas CTM. Não há dados relacionando o hipotireoidismo e a diminuição dos hormônios ovarianos com as CTM da medula-óssea, pode se pensar que talvez haja esse aumento devido a tentativa de uma reestruturação das duas glândulas, já que essa situação dupla pode ser prejudicial para o organismo. Mas, seriam necessários maiores estudos para um melhor entendimento do porque essas células e suas sub-populações, sem esses hormônios, têm sua população aumentada.

## 6. CONCLUSÕES

- O hipotireoidismo aumenta a porcentagem das células endoteliais, sendo possível inferir duas alternativas: a primeira seria a tentativa de uma reestruturação da glândula da tireóide, portanto, haveria um aumento na produção dessas células na medula óssea. A segunda seria que os hormônios tireoidianos possuem um papel fundamental na atividade proliferativa das células endoteliais, sendo que sem esses hormônios não há controle na proliferação.
- No hipotireoidismo, com o aumento das células endoteliais, a chance de aterosclerose pode aumentar, devido ao fato do aumento dessas células na corrente sanguínea.
- Em situações de ooforectomia, há um aumento da linfopoiese das células da linhagem B, tanto maduras quanto imaturas, sendo que em alguns casos a porcentagem de células chega a dobrar em relação ao controle.
- A ausência do estrogênio, que tem caráter anti-apoptótico nas células-tronco mesenquimais, fez com que a sub-população de fenótipo CD73+ e CD106+ diminuísse sua porcentagem de células.
- Com a retirada das duas glândulas, o grupo em questão teve um aumento na porcentagem de suas células-tronco mesenquimais, pode-se pensar que isto se dá ao fato de uma tentativa de reestruturação dessas glândulas, portanto ocorre esse aumento de células na medula óssea.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. Molecular Biology of The Cell. **Garland Science**. 4 ed., p. 833-835, 2002.

AYALOGLU-BUTUN, F.; TERZIOGLU-KARA E.; TOKCAER-KESKIN Z. The Effect of Estrogen on Bone Marrow-Derived Rat Mesenchymal Stem Cell Maintenance: Inhibiting Apoptosis Through the Expression of Bcl-xL and Bcl-2. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, 2011.

BARRA G. B.; VELASCO L. F. R.; PESSANHA R. P.; CAMPOS A. M.; MOURA F. N.; DIAS S. M. G.; POLIKARPOV I.; RIBEIRO R. C. J.; SIMEONI L. A.; NEVES F. A. R. Molecular Mechanism of Thyroid Hormone Action. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, p. 23-38, 2004.

BARROS L. F. M.; MACHADO T. F. S.; FERRAZ V. M.; FERRIGINO C. R. A. Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs): Modo de Ação, Aplicação e Carreadores. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 9, p. 1-8, 2006.

CARVALHO K. A. T.; GUARITA-SOUZA L.C.; SIMEONE R.B.; FRANCISCO J. C.; OLANDOSKI M.; GREMSKI W. Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells, skeletal muscle cells and co-culture of both for cell myocardium therapy in wistar rats. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p. 1955-1956, 2006.

CHACHQUES J. C.; ACAR C.; HERREROS J.; TRAININI J. C.; PROSPER F.; D'ATTELLIS N. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 77, p. 1021-1030, 2004.

CHEN Y.; JIN X.; ZENG Z.; LIU W.; WANG B.; WANG H. Estrogen-replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing SDF-1 and estrogen receptor expression. **Microvascular Research**, v. 77, p. 71-77, 2009.

DAVIS P. J.; DAVIS F. B. Nongenomic Actions of Thyroid Hormone on the Heart. **Thyroid**, v. 12, p. 459-464, 2002.

DAVIS P.J.; LEONARD J.L.; DAVIS F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, p. 211-218, 2008.

DENG J.; PERTERSEN B. E.; STEINDLER D. A.; JORGENSEN M. L.; LAYWELL E. D. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture, and are neurogenic after transplantation. **Stem Cells**, v. 24, p. 1054-1064, 2006.

ERBEN R. G.; RAITH S.; EBERLE J.; STANGASSINGER M. Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation of monocyte-macrophage precursors in rat bone marrow. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 274, p. E476-E483, 1998.

FOSTER, M. P.; MONTECINO-RODRIGUEZ E.; DORSHKIND K. Proliferation of Bone Marrow Pro-B Cells Is Dependent on Stimulation by the Pituitary/Thyroid Axis. **The Journal of Immunology**, v.163, p. 5883-5890, 1999.

GROUND S. D.; WHITE J. D.; ROSENTHAL N.; BOGOYEVITCH M. A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, p. 589-610, 2002.

HUBSCHER C. H.; BROOKS D. L.; JOHNSON J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 80, p. 79-87, 2005.

KIT S.; BECK C.; GRAHAM O. L.; GROSS A. Effect of 5-bromodeoxyuridine on deoxyribonucleic acid-thymine synthesis and cell metabolism of lymphatic tissues and tumors. **Cancer Research**, v.18, p. 598-608, 1958.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6, p. 1-148, 1922.

MANDL, A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 576-584, 1951.

MASUZAWA T.; MIYAURA C.; ONOE Y.; KUSANO K.; OHTA H.; NOZAWA S.; SUDA T. Estrogen Deficiency Stimulates B Lymphopoiesis in Mouse Bone Marrow. **The American Society for Clinical Investigation**, v. 94, p. 1090-1097, 1994.

TAGAMI T.; YAMAMOTO H.; MORIYAMA K.; SAWAI K.; USUI T.; SHIMATSU A.; NARUSE M. The retinoid X receptor binding to the thyroid hormone receptor: relationship with cofactor binding and transcriptional activity. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 42, p. 415-428, 2009.

TANG L.; GAO Y.; ZHANG Z.; LI H.; SHAN Y. Q. Human bone marrow multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells with hepatocyte growth factor plus fibroblasts growth factor-4 in vitro. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 9, p. 652-655, 2005.

TERADA N.; HAMAZAKI T.; OKA M.; HOKI M.; MASTALERZ D. M.; NAKANO Y. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v. 416, p. 542-545, 2002.

WERNER N.; KOSIOL S.; SCHIEGL T.; AHLERS P.; WALENTA K.; LINK A. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 999-1007, 2005.

YE M.; CHEN S.; WANG X.; QI C.; LU G.; LIANG L. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat. **Neuroreport**, v. 16, p. 581-584, 2005.

ZENOVICH A. G.; TAYLOR D. A. Atherosclerosis as a disease of failed endogenous repair. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3621-3636, 2009.

ZHOU S.; TURGEMAN S.; HARRIS S. E.; LEITMAN D. C.; KOMM B. S.; BODINE P. V. N.; GAZIT D. Estrogens Activate Bone Morphogenetic Protein-2 Gene

Transcription in Mouse Mesenchymal Stem Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 17,  
p. 56-66, 2003.